



KURKIME ATEITĮ DRAUGE!

PROJEKTAS „MAGISTRANTŪROS IR DOKTORANTŪROS STUDIJŲ MODULIŲ KŪRIMAS IR PROGRAMŲ ATNAUJINIMAS STRATEGINĖSE BIO-MOKSLŲ SRITYSE“

Baltymų fizikinė chemija

Daumantas Matulis

Apsvarstė ir rekomendavo Vilniaus Universiteto Chemijos fakulteto taryba
(2008 m. kovo 12 d., protokolas Nr. 55).

Recenzavo: prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius

Leidinį finansuoja Europos Sąjungos struktūrinių fondų paramos 2.5 priemonės projektas „Magistrantūros ir doktorantūros studijų modulių kūrimas ir programų atnaujinimas strateginėse modernių biomedicinos srityse“. Sutarties Nr. ESF/2004/2.5.0-03-430/BPD-199/ParS-12500-602, SFMIS Nr. BPD2004-ESF-2.5.0-03-05/0095). Projektą remia Lietuvos Respublika. Projektą iš dalies finansuoja Europos Sąjunga.

Mokomoji knyga skirta Vilniaus universiteto magistrantūros studijų programos „Biochemija“ (62104P101) studentams.

LEIDINYS PLATINAMAS NEMOKAMAI

© D. Matulis, 2008

© Vilniaus universitetas, 2008

ISBN 978-9955-25-428-7

Turinys

Turinys	3
Ižanga	6
1. Biotermodinamika	12
1.1. Termodinamikos pagrindai	12
1.1.1. Įvadas	12
1.1.2. Ekstensyvūs ir intensyvūs kintamieji	12
1.1.3. Konversijos faktoriai tarp kalorijos ir džaulio	12
1.1.4. Dalinis diferencijavimas	12
1.1.5. Visuotinio diferencijavimo lygtis	12
1.1.6. Konversijos formulės	13
1.1.6.1. Pirmoji formulė	13
1.1.6.2. Antroji formulė	14
1.1.6.3. Trečioji formulė	14
1.1.6.4. Ketvirtoji formulė	14
1.1.6.5. Penktoji formulė	15
1.1.6.6. Tikslieji diferencialai	15
1.1.6.7. Pavyzdys nagrinėjant gravitacinį lauką	15
1.1.6.8. Bendrosios formulės	15
1.1.6.9. Grįžtamumo charakteristika	16
1.1.7. Termodinaminės savybės	17
1.1.7.1. Entalpija	17
1.1.7.2. Šiluminė talpa	17
1.1.7.3. Išvestinės lygtys	18
1.1.7.4. Entropija	18
1.1.7.5. Helmholtco laisvoji energija	18
1.1.7.6. Gibso laisvoji energija	18
1.1.7.7. Maseu funkcija	19
1.1.7.8. Planko funkcija (<i>Planck function</i>)	19
1.1.7.9. Grįžtamumo taisyklė	19
1.1.7.10. Išvestiniai ryšiai tarp termodinaminių funkcijų (parametrų)	19
1.1.7.11. Suspaudžiamumas ir plėtimosi koeficientas	20
1.1.7.12. Ribos, kai temperatūra artėja prie absoliučiojo nulio	21
1.2. Mažųjų molekulių sąveikos termodinamika	21
1.2.1. Įvadas	21
1.2.2. Įvadas apie vandenį	22
1.2.3. Vandens fazių diagrama	22
1.2.4. Vandens struktūrinis modelis	23
1.2.5. Vandens anomalijos	24
1.2.5.1. Vandens fazių anomalijos	24
1.2.5.2. Vandens tankio anomalijos	25
1.2.5.3. Vandens medžiaginės anomalijos	25
1.2.5.4. Vandens termodinaminės anomalijos	26
1.2.5.5. Vandens fizikinės anomalijos	26
1.2.6. Cheminių junginių termodinaminės savybės	26
1.2.7. Faziniai virsmas ir sąveikos energija	28
1.3. Izoterminio titravimo kalorimetrija	30
1.3.1. Įvadas	30
1.3.2. Kalorimetrai	31
1.3.3. Eksperimento pradžia, duomenų apdorojimas	34
1.3.4. 1:1 stochiometrijos modelis	36

1.3.5. Kalorimetro kalibravimas ir tikrinimas	40
1.3.6. Stebimų termodinaminių parametrų interpretavimas	40
1.3.7. Protonizacijos reiškinių interpretavimas.....	41
1.3.8. Šiluminė talpa	44
1.3.9. Jungimosi konstantų nustatymo intervalo padidėjimas	44
1.3.10. Titravimo kalorimetrijos metodo lyginimas su kitais metodais	45
1.3.11. IC ₅₀ modelis	46
1.4. Baltymų denatūracijos termodinaminis modelis	48
1.5. Diferencinė žvalgos (skenavimo) kalorimetrija.....	52
1.5.1. Įvadas	52
1.5.2. DSC pagrindai	53
1.5.3. DSC kalorimetrai	53
1.5.4. DSC eksperimentas.....	55
1.5.5. DSC duomenų analizė	55
1.5.6. Pagrindinės linijos pasirinkimas	57
1.5.7. DSC duomenų analizė ir interpretavimas	57
1.5.8. DSC taikymas ligandų jungimuisi ir stabilumui tam tikromis sąlygomis nustatyti	60
1.6. Baltymų ir ligandų jungimosi ir stabilizavimo termodinaminis modelis	61
1.7. Terminio poslinkio metodas	67
1.7.1. Terminio poslinkio metodo teorija ir taikymas ligandų jungimosi konstantoms nustatyti...	67
1.7.2. Terminio poslinkio metodo taikymas apibūdinant rekombinantinių baltymų stabilumą ..	71
2. Fluorescencija ir spektrofotometrija ir jų taikymas baltymų tyrimams	79
2.1. Fluorescencijos spektroskopija.....	79
2.1.1. Bendrosios savokos	79
2.1.2. Fluorescencijos gyvavimo periodai, kvantinė išėiga ir gesimas.....	82
2.1.3. Fluorescencijos anizotropija	83
2.1.4. Fluorescencijos rezonansinės energijos perdavimas	84
2.1.5. Nekintanti ir nuo laiko priklausoma fluorescencija.....	85
2.1.6. Biocheminiai fluoroforai ir indikatoriai.....	86
2.2. UV-VIS spektrofotometrija	87
2.2.1. Spektrofotometrijos praktiniai dėsningumai.....	87
2.3. Sugerties ir fluorescencijos ryšys su struktūra.....	91
2.3.1. Fluoroforų konstravimas.....	91
2.3.2. Solvatochromija.....	94
2.3.3. Fluorimetro kalibravimas norint apskaičiuoti fluorescencijos kvantinę išėigą	96
2.3.4. Anilino naftalino sulfonato fluorescencijos spektrai	99
2.3.5. ANS fluorescencija įvairiuose vandens-DMSO mišiniuose.....	100
2.3.6. Vidinio filtro reiškinys.....	101
3. Magnetinio branduolių rezonanso metodai	104
3.1. Įvadas.....	104
3.2. MBR principai	104
3.2.1. Branduolio kampinis momentas ir magnetinis momentas.....	104
3.2.2. Branduoliai statiniame magnetiniame lauke.....	105
3.2.3. Rezonanso sąlyga.....	106
3.2.4. Branduolio ekranavimas, cheminis poslinkis	107
3.2.5. Sukinių sąveika	110
3.3. Dvimačiai MBR spektrai	114
3.3.1. Įvadas.....	114
3.3.2. COSY ir TOCSY spektrai	115
3.3.3. HETCOR spektras	117
3.3.4. NOESY spektras.....	118
3.4. MBR naudojimas baltymo struktūrai ir dinamikai nustatyti	120
3.4.1. Polipeptidų MBR spektrai	120
3.4.2. Magnetinio rezonanso tomografijos pagrindai	122

3.4.3. MBR metodo santrauka	123
4. Rentgenostruktūrinė kristalografinė baltymų analizė	125
4.1. Įvadas	125
4.2. Kristalinė gardelė	125
4.3. Baltymų kristalų auginimas	126
4.4. Kristalų analizė ir duomenų rinkimas	129
4.4.1. Rentgeno spindulių kilmė ir panaudojimas	129
4.4.2. Kristalinės gardelės parinkimas	129
4.4.3. Kristalinių gardelių sistemos ir simetrija	131
4.4.4. Rentgeno spindulių difrakcija, Brego dėsnis	134
4.4.5. Duomenų rinkimas, skiriamoji geba	136
4.5. Baltymo struktūros sprendimas	139
4.5.1. Įvadas	139
4.5.2. Struktūriniai elementai: atspindžių banginis aprašymas	139
4.5.3. Elektroninio tankio žemėlapiai	140
4.5.4. Fazių nustatymas	140
4.5.5. Molekulinio modelio sudarymas ir tikslinimas	141
4.6. Rentgenostruktūrinės baltymų analizės naudojimas	143
4.6.1. Įvairūs baltymų struktūros vaizdavimo būdai	143
4.6.2. Naudojimasis baltymų duomenų baze	147
5. Naudota bei rekomenduojama literatūra	148
6. Angliškų terminų rodyklė	149

Ižanga

Baltymai sudaro vieną pagrindinių gyvybės cheminio pagrindo sudedamųjų dalių. Jie atlieka praktiškai visas biologines funkcijas žmogaus organizme, todėl knygos pavadinime pabrėžiu baltymų svarbą. Tačiau baltymai veikia tik vandenyje, kuriame yra ir lipidų, ir angliavandenių, ir nukleorūgščių, ir kitų medžiagų, su kuriomis baltymai sąveikauja ir kurios turi didelę įtaką baltymų funkcijoms. Ši knyga yra apie tokias silpnąsias sąveikas, apie sąveikos energijų matavimus ir teorinius jungimosi modelius.

Klasikinės biochemijos, bioorganinės chemijos ir kitų kursų metu mes gana išsamiai susipažįstame su pirmine baltymų struktūra, jų cheminėmis savybėmis, baltymų cheminiu modifikavimu ir jų biosinteze ribosomoje. Visus šiuos procesus ir reiškinius lydi dideli energijų virsmai, nes kovalentinėms jungtims sudaryti ir suardyti reikia maždaug 500 kJ/mol energijos. Tačiau didelė dalis procesų, lemiančių baltymų funkcijas, nereikalauja tokių didelių energijos sąnaudų. Kambario temperatūros terminė energija yra lygi RT (čia R – universalioji dujų konstanta, T – temperatūra kelvinais), tai sudaro apie 2,5 kJ/mol. Šioje knygoje nagrinėjame virsmus, kuriems retai reikia didesnės kaip 100 kJ/mol energijos.

Per pastarąjį dešimtmetį labai paplito fizikinių metodų taikymas spręsti biologines problemas. Labai išplėtoti tokie metodai, kaip įvairios spektroskopijos, masės spektrometrija, magnetinis branduolių rezonansas (MBR), analitinis ultracentrifugavimas, rentgenostruktūrinė kristalografinė analizė ir vienetinių molekulių metodai, glaudžiai susiję su nanobiotechnologijomis. Šių metodų taikymas labai pagilino ir pajavairino mūsų žinias apie baltymus.

Vienas svarbiausių šios knygos tikslų yra išsamiai supažindinti su metodais, kurie padeda pamatuoti baltymų jungimosi su kitomis molekulėmis vandenyje energiją. Šie metodai taip pat gerokai patobulėjo pastaraisiais dešimtmečiais. Tai pusiausviros dializė ir kiekybinė jungimosi chromatografija, analitinis ultracentrifugavimas, paviršiaus plazmono rezonansas, kapiliarinė elektroforezė, molekulinė elektrooptika, rentgeno ir neutronų spindulių išbarstymas, rentgenostruktūrinė analizė, cirkuliarinis dichroizmas, fluorescenciniai jungimosi metodai, sustabdyto tekėjimo metodai, infraraudonosios spinduliuotės (Ramano) spektroskopija, jonizacinė masės spektrometrija, elektronų paramagnetinis rezonansas, MBR spektroskopija, atominės jėgos mikroskopija bei daug kitų metodų.

Mums svarbiausi yra izoterminio titravimo kalorimetrijos, diferencinės skenavimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodai, kuriais detalai matuojame daugelį termodinaminių parametrų, ne vien laisvąją Gibso energiją. Taigi šioje knygoje išsamiau nagrinėjame iš pirmo žvilgsnio gana siaurą, tačiau, mano nuomone, labai svarbią biofizikinės chemijos ir biotermodinamikos sankirtoje esančią mokslo sritį.

Fizikinė biochemija neišvengia matematinių lygčių. Šioje knygoje jų yra gana daug. Norėdamas, kad būtų lengviau suvokiamos, stengiausi priklausomybes parodyti grafiškai. Be to, fizikinės chemijos

kursų metu dėstomą termodinamiką pakartojame gana glaustai, nes tikimės, jog studentai su ja jau gerai susipažinę. Tačiau realiai žinau, kad matematinių metodų taikymas biologams yra gana sudėtingas, todėl pratybų metu stengiamės grafiškai nagrinėti tokias problemas kaip išvestinių skaičiavimas.

Beveik kiekvienas biocheminis eksperimentas reikalauja gautų duomenų matematinio apdorojimo. Modelis nesudėtingas, jeigu priklausomybė yra tiesinė. Tačiau dažniausiai priklausomybė yra gana sudėtinga, o jos sprendimas vis tiek yra labai pageidautinas. Tik lygindami modeliavimo rezultatus su eksperimentų rezultatais galime teigti, kad problemą nors iš dalies supratome.

Šią knygą sudaro keturi skyriai – biotermodinamikos, fluorescencijos, magnetinio branduolių rezonanso ir kristalografijos. Pasirinkau juos iš dalies dėl to, kad teko ne vienerius metus dirbti kiekvienu iš šių metodų bei sukaupti nemažai patirties, o taip pat dėl to, kad būtent šie metodai man pasirodė patys įdomiausi, atvėrė duris naujam biomolekulių pažinimui. Nežiūrint to, kad visi šie keturi metodai jau seniai tapo klasika, bet jie nuolatos evoliucionuoja ir atveria naujas galimybes tyrimams. Manau, kad būtent šiuose metoduose ir ateityje bus didelių patobulinimų ir juos gerai suprasti bus tiek pat svarbu kaip ir įprastiniais Lietuvoje tapusius molekulinės biologijos metodus.

Šia proga noriu padėkoti savo chemijos mokytojai Veronikai Paberžytei, studentinių darbų vadovui Jonui Rubikui ir doktorantūros vadovui Rex Lovrien, kurie įdėjo labai daug darbo mane mokydami. Taip pat dėkoju Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto darbuotojams, kurių projektas išjudino šios knygelės išleidimą, ir savo šeimai už supratimą bei nuolatinį palaikymą.

Daumantas Matulis, 2008 m. sausis

Santrumpos

Skliausteliuose nurodyti kai kurias santrumpas apibrėžiantys skyreliai

A – laisvoji Helmholco energija

A – šviesos sugertis (absorbcija)

ANS – anilinaftalino sulfonatas

Å – angstrems, atstumo vienetas naudojamas kristalografijoje

B_0 – magnetinio lauko stiprumas (stipris)

β – plėtimosi koeficientas

β – kampas vienetinėje kristalinėje gardelėje

°C – Celsijaus laipsnis

C – šiluminė talpa

C_P – pastovaus slėgio šiluminė talpa

C_V – pastovaus tūrio šiluminė talpa

c – koncentracija

c – koeficientas kalorimetrijoje, parodantis reakcijos pilnumą

cal – šiluminės energijos vienetas kalorija,

cal_{IT} – tarptautinės konferencijos kalorija (1.1.3)

cal_{th} – termocheminė kalorija (1.1.3)

const - konstanta

∂ – dalinės išvestinės ženklas

d – tikslusis diferencialas

D – netikslusis diferencialas

Δ – pokytis

$\Delta_b X$ – jungimosi reakcijos termodinaminis parametras (pvz., $\Delta_b H$ – jungimosi entalpija)

$\Delta_u X$ – baltymo išsivyniojimo (denatūracijos) reakcijos termodinaminis parametras (pvz.,

$\Delta_u H_{T_m}$ - denatūracijos entalpija lydymosi temperatūroje T_m)

ΔH_{cal} – kalorimetrinė entalpija

ΔH_{vH} – van't Hofo entalpija

δ – dalinis dydis, pvz., δH – dalinė entalpija

δ – cheminis poslinkis MBR

DMSO – dimetilsulfoksidas

DSC – *differential scanning calorimetry* (diferencinė skenavimo kalorimetrija)

DSK – diferencinė skenavimo kalorimetrija

E – magnetinio dipolio energija MBR

ε_λ – molinis ekstinkcijos koeficientas

F – termodinaminė funkcija

F_λ – fluorescencijos išeiga λ bangos ilgyje

f_b – prisijungusi frakcija

F_{hkl} – struktūrinis elementas kristalografijoje

FT – Furjė transformacija

H – entalpija

h – planko konstanta

hCAI – žmogaus karboanhidrazė I

hCAII – žmogaus karboanhidrazė II

HSA – žmogaus serumo albuminas

G – laisvoji Gibso energija

G – priešdėlis giga (10^9)

γ – gyromagnetinis santykis

I – šviesos intensyvumas

I – branduolio sukinys

IC₅₀ – fermento slopinimo rodiklis, tokia slopiklio koncentracija, kuriai esant 50 proc. aktyvumo yra užslopinta

ITC – isothermal titration calorimetry (izoterminio titravimo kalorimetrija)

ITK – izoterminio titravimo kalorimetrija

J – džaulis, SI sistemos energijos vienetas

J – Massieu termodinaminė funkcija

J_{AB} – branduolių A ir B surišimo konstanta

K – kelvino laipsnis

K – pusiausvyros konstanta grįžtamajame procese

k – priešdėlis kilo (10^3)

k_B – Bolcmano konstanta

K_a – rūgšties disociacijos konstanta

K_b – jungimosi pusiausvyros konstanta

K_d – disociacijos pusiausvyros konstanta

K_u – baltymo išsivyniojimo (denatūracijos) pusiausvyros konstanta

κ – suspaudžiamumas

L – ligando koncentracija

l – kiuvetės plotis, šviesos kelio ilgis kiuvetėje

L_b – prisijungusio ligando koncentracija (b - bound)

LD₅₀ – junginio toksiškumo rodiklis, tokia junginio koncentracija, kuriai esant 50 proc. gyvūnų išlieka

LD – *lethal dose*

L_f – laisvo ligando koncentracija (*f - free*)

L_t – bendra ligando koncentracija (*t - total*)

M – makromolekulės koncentracija

M – molinės koncentracijos vienetas

M – smailių skaičius multiplete (MBR)

M – priešdėlis mega (10^6)

m – priešdėlis mili (10^{-3})

m – magnetinis kvantinis skaičius

MBR – magnetinis branduolių rezonansas

ML – makromolekulės-ligando komplekso koncentracija

mol – medžiagos kiekio vienetas molis

μ – magnetinis momentas

μ – priešdėlis mikro (10^{-6})

n – priešdėlis nano (10^{-9})

n – branduolių skaičius MBR

n – sujungtų protonų skaičius ITK

n – ITK stochiometrija

NMR – *nuclear magnetic resonance* (magnetinis branduolių rezonansas)

ν – dažnis (Larmor dažnis, rezonanso dažnis)

P – slėgis

P – fluorescencijos poliarizacija

P – branduolio kampinis momentas

p – priešdėlis piko (10^{-12})

P_b – prisijungusio baltymo koncentracija (*b - bound*)

P_f – laisvo baltymo koncentracija (*f - free*)

pK_a – rūgšties disociacijos konstantos neigiamas logaritmas

P_N – tikimybė baltymui būti natyvioje būsenoje (*N - native*)

P_t – bendra baltymo koncentracija (*t - total*)

P_U – tikimybė baltymui būti išsivyniojusioje būsenoje (*U - unfolded*)

Q – šilumos kiekis

Q – fluorescencijos kvantinė išeiga

R – dujų konstanta

R – faktorius, parodantis rentgenostruktūrinės analizės paklaidą

r – fluorescencijos anizotropija
 r – tarpmolekulinis, tarpbranduolinis atstumas
 R_0 – Fiorsterio atstumas fluorescencijoje
 $\rho(x, y, z)$ – elektronų tankio funkcija kristalografijoje
 S – entropija
 S_λ – solvatochromija bangos ilgyje λ
 σ – ekranavimo konstanta MBR
 T – temperatūra
 T – transmisija (šviesos pralaidumas)
 T_m – baltymo lydymosi temperatūra (*m - melting*)
TMS – tetrametilsilanas
 T_r – baltymo lydymosi temperatūra, kai nėra pridėta ligando (*r - reference*)
 T_0 – palyginamoji temperatūra, dažniausiai 37 °C
 U – vidinė energija
 V – tūris
 V_m – molinis tūris
 W – darbas
 W – galios vienetų vatas
 Y – Planko termodinaminė funkcija

1. Biotermodinamika

1.1. Termodinamikos pagrindai

1.1.1. Įvadas

Šiame skyriuje trumpai ir glaustai pakartojame pagrindinius termodinamikos teiginius ir formules. Pagrindinis dėmesys skiriamas termodinaminių funkcijų (parametrų) įvairovei bei jų tarpusavio ryšiams. Termodinamikos pagrindų skyrius parašytas remiantis cheminės termodinamikos vadovėliu [1], kurį rekomenduoju pakartoti, kad būtų lengviau suprasti vartojamas sąvokas.

1.1.2. Ekstensyvūs ir intensyvūs kintamieji

Studijuodami termodinamiką, skiriame kintamuosius, kurie nepriklauso nuo medžiagos kiekio sistemoje, t.y. intensyvūs kintamieji (*intensive variables*), ir kintamuosius, kurie priklauso nuo medžiagos kiekio ir yra proporcingi medžiagos kiekiui sistemoje, t.y. ekstensyvūs kintamieji (*extensive variables*).

1.1.3. Konversijos faktoriai tarp kalorijos ir džaulio

Atliekant tikslius termodinaminius skaičiavimus ir matavimus, svarbus yra konversijos faktorių tikslumas. Tam tikrą painiavą sukelia du kalorijos apibrėžimai, kurie kai kuriuose literatūros šaltiniuose painiojami. Skaičiavimams vartotina termocheminė kalorija, kuri tiksliai susijusi su džauliu.

Kalorijos (žym. cal) vertė priimta Penktojoje tarptautinėje garo savybių konferencijoje Londone 1956 m. (vadinama IT – *international conference*), $1 \text{ cal}_{\text{IT}} = 4,186800 \text{ J}$, t.y. viena tarptautinė kalorija yra apytiksliai lygi 4,186800 džaulio.

Tuo tarpu termocheminė kalorija yra senesnė ir tiksliai lygi 4,184 džaulio, $1 \text{ cal}_{\text{th}} = 4,184 \text{ J}$. Šią kalorijos vertę mes taikome termodinaminiam skaičiavimams. Tada universalioji dujų konstanta R lygi $1,9872 \text{ cal}/(\text{mol} \times \text{K})$, arba $8,3144 \text{ J}/(\text{mol} \times \text{K})$.

1.1.4. Dalinis diferencijavimas

Termodinaminės sistemos būseną yra daugiau negu vieno nepriklausomojo kintamojo funkcija, todėl svarbu nagrinėti matematinius ryšius, aprašančius šias funkcijas. Dauguma termodinaminių problemų turi tik du nepriklausomuosius kintamuosius. Jų išplėtimas didesniajam kintamųjų skaičiui gana aiškus, todėl čia nurodome tik funkcijas su dviem kintamaisiais.

1.1.5. Visuotinio diferencijavimo lygtis

Panagrinėkime konkretų pavyzdį – grynosios medžiagos tūrį. Grynosios medžiagos molinis tūris (V_m) yra temperatūros ir slėgio funkcija:

$$V_m = f(P, T). \quad (1)$$

Šios funkcijos visuotinis diferencialas yra:

$$dV_m = \left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_T dP + \left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P dT. \quad (2)$$

Idealiųjų dujų molinis tūris yra:

$$V_{m_idealiųjų_dujų} = \frac{RT}{P}. \quad (3)$$

Čia R yra universalioji dujų konstanta. Išreiškiame šios formulės dalines išvestines, atsižvelgdami į slėgį ir temperatūrą:

$$\left(\frac{\partial V_{m_id_dujų}}{\partial P} \right)_T = -\frac{RT}{P^2}, \quad (4)$$

$$\left(\frac{\partial V_{m_id_dujų}}{\partial T} \right)_P = \frac{R}{P} \quad (5)$$

Gauname visuotinį diferencialą idealioms dujoms:

$$dV_m = -\frac{RT}{P^2} dP + \frac{R}{P} dT. \quad (6)$$

1.1.6. Konversijos formulės

Dažnai nebūna patogaus eksperimentinio metodo, padedančio pamatuoti išvestinę, kurios reikia problemai išspręsti. Tokiu atveju reikia gauti dalinę išvestinę ir susieti ją su kitais dydžiais, kurie yra pasiekiami. Svarbiausia pastebėti, kad, ieškant konkrečios dalinės išvestinės, reikia pradėti nuo visuotinės išvestinės, atsižvelgiant į kintamąjį ir apskaičiuojant abiejų diferencialų santykį. Panagrinėkime anksčiau išvestą tūrio funkciją.

1.1.6.1. Pirmoji formulė

Jei norime apskaičiuoti $(\partial P / \partial T)_V$, vartojame (2) formulę, dalijame abi puses iš dT . Be to, $dV_m = 0$, mes gauname:

$$\frac{dV_m}{dT} = 0 = \left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_T \frac{dP}{dT} + \left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P. \quad (7)$$

Jei prie dešinės pusės pirmojo dėmens antrojo daugiklio pažymime, kad $V_m = \text{const}$, gauname:

$$\left(\frac{\partial P}{\partial T} \right)_V = \frac{-\left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P}{\left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_T}. \quad (8)$$

Taigi, jei norėjome apskaičiuoti $(\partial P/\partial T)_V$, bet neturėjome metodo ją eksperimentiškai pamatuoti, mes galime lengviau gauti $(\partial V_m/\partial P)_T$ ir $(\partial V_m/\partial T)_P$, kurie susiję su terminio plėtimosi koeficientu (*expansion coefficient*) β ir suspaudžiamumo koeficientu (*compressibility*) κ :

$$\beta = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P. \quad (9)$$

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T. \quad (10)$$

Norėdami patikrinti lygtį (8), patikrinimui galime pasinaudoti idealiųjų dujų atveju:

$$\left(\frac{\partial P}{\partial T} \right)_V = \frac{-\frac{R}{P}}{-\frac{RT}{P^2}} = \frac{P}{T} = \frac{R}{V_m}. \quad (11)$$

1.1.6.2. Antroji formulė

Norėdami apskaičiuoti dV_m/dP , gauname antrąją formulę iš dP , taip pat $V_m = \text{const}$:

$$\frac{dV_m}{dP} = 0 = \left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_T + \left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P \left(\frac{\partial T}{\partial P} \right)_V. \quad (12)$$

Perstatę gauname:

$$\left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_T = - \left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P \left(\frac{\partial T}{\partial P} \right)_V \quad (13)$$

arba:

$$\left(\frac{\partial T}{\partial P} \right)_V = - \frac{\left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_T}{\left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P}. \quad (14)$$

1.1.6.3. Trečioji formulė

Iš (8) ir (14) formulių matome, kad:

$$\left(\frac{\partial P}{\partial T} \right)_V = \frac{1}{\left(\frac{\partial T}{\partial P} \right)_V}. \quad (15)$$

Taigi dalinės išvestinės gali būti taip vartojamos tarsi jos būtų trupmenos.

1.1.6.4. Ketvirtoji formulė

Ši formulė gali būti naudinga, kai vartojame naujus nepriklausomuosius kintamuosius. Pavyzdžiui, nagrinėjame grynosios medžiagos tūrį V kaip slėgio ir vidinės energijos (U) funkciją:

$$V = f(U, P). \quad (16)$$

Norime įvertinti dalinę išvestinę $(\partial V_m / \partial P)_U$, t.y. tūrio kitimą kintant slėgiui, kai vidinė energija yra pastovi. Šią išvestinę apskaičiuoti, remiantis kitomis dalinėmis išvestinėmis, reikia lygtyje (2) dalyti dV_m iš dP ir pridėti sąlygą, kad $U = \text{const}$. Tada rezultatas yra:

$$\left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_U = \left(\frac{\partial V_m}{\partial P} \right)_T + \left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P \left(\frac{\partial T}{\partial P} \right)_U. \quad (17)$$

1.1.6.5. Penktoji formulė

Kai reikia naujo kintamojo $X(P, T)$, taikome grandininę taisyklę diferenciniam skaičiavimui:

$$\left(\frac{\partial V_m}{\partial T} \right)_P = \left(\frac{\partial V_m}{\partial X} \right)_P \left(\frac{\partial X}{\partial T} \right)_P. \quad (18)$$

1.1.6.6. Tikslieji diferencialai

Daug termodinamikos lygčių galima išvesti naudojantis tiksliojo diferencialo savybėmis. Vartojame tokią nomenklatūrą: D – netikslusis diferencialas (*inexact differential*), pvz., DW , d – tikslusis diferencialas (*exact differential*), pvz., dU .

1.1.6.7. Pavyzdys nagrinėjant gravitacinį lauką

Palyginkime potencinę energiją (ΔU) su darbu (W), kai akmuo yra pernešamas aukštyn į kalną. Šie dydžiai skiriasi tam tikromis savybėmis.

1. Potencinės energijos skirtumas priklauso nuo akmens pradinio ir galinio aukščio, o atliktas darbas (taip pat ir išsiskyrusi šiluma) priklauso nuo kelio, kuriuo buvo nešamas akmuo.
2. Potencinei energijai U tinka išraiška, kuri gali būti diferencijuojama, jei norima gauti dU , o darbui W nėra išraiškos, norint gauti DW .
3. Gautos potencinės energijos ir darbo vertės skirsis, jei panaudosime ciklinį kelią (užnešime akmenį ir vėliau parnešime į tą pačią vietą). Tokiu atveju potencinės energijos skirtumas lygus nuliui:

$$\oint dU = 0. \quad (19)$$

Tačiau ciklo metu atlikto darbo vertė nebus lygi nuliui ir priklausys nuo konkretaus pasirinkto kelio.

1.1.6.8. Bendrosios formulės

Norėdami geriau suprasti tiksliojo diferencialo išraišką, pasirenkame bendrąją funkciją $L(x, y)$ ir randame jos visuotinį diferencialą. Taip parodome, jog dalinės išvestinės yra nepriklausomųjų kintamųjų (x ir y) funkcijos ir diferencialas yra nepriklausomųjų kintamųjų ir jų diferencialų funkcija:

$$dL(x, y, dx, dy) = M(x, y)dx + N(x, y)dy. \quad (20)$$

Čia:

$$M(x, y) = \left(\frac{\partial L}{\partial x} \right)_y \quad (21)$$

ir

$$N(x, y) = \left(\frac{\partial L}{\partial y} \right)_x. \quad (22)$$

Iš lygties (20) matome, kad bendruoju atveju dL yra pasirinkto kelio funkcija. Ši lygtis padeda susumuoti tiksliojo diferencialo savybes:

1. Egzistuoja funkcija $f(x, y)$, kad

$$df(x, y) = dL(x, y, dx, dy). \quad (23)$$

Kitaip sakant, diferencialas yra tik koordinačių funkcija ir nepriklauso nuo pasirinkto kelio.

2. Integralo vertė pasirinktame specifiniame kelyje

$$\int_1^2 dL(x, y, dx, dy) = \int_1^2 df(x, y). \quad (24)$$

priklauso tik nuo pradinės ir galinės koordinatės ir nepriklauso nuo pasirinkto kelio.

3. Integralas cikliniu keliu lygus nuliui:

$$\oint dL(x, y, dx, dy) = \oint df(x, y) = 0. \quad (25)$$

Ši paskutinė savybė yra dažniausiai naudojama tikrinant termodinaminės funkcijos tikslumą. Jeigu termodinaminės funkcijos J diferencialas dJ yra tikslusis, tada J yra vadinama termodinamine savybe (parametru) (*thermodynamic property, parameter*) arba būsenos funkcija (*state function*).

1.1.6.9. Grįžtamumo charakteristika

Diferencialo $dL(x, y, dx, dy)$ tikslumo testas parodo, ar tinka jam ši lygtis:

$$\left(\frac{\partial}{\partial y} M(x, y) \right)_x = \left(\frac{\partial}{\partial x} N(x, y) \right)_y. \quad (26)$$

Matome, kad ši lygtis yra teisinga, jeigu dL yra tikslusis, nes tuo atveju egzistuoja funkcija $f(x, y)$:

$$dL(x, y, dx, dy) = df(x, y) = \left(\frac{\partial f}{\partial x} \right)_y dx + \left(\frac{\partial f}{\partial y} \right)_x dy. \quad (27)$$

Iš lygčių (23) ir (27) paaiškėja, kad:

$$M(x, y) = \left(\frac{\partial f}{\partial x} \right)_y. \quad (28)$$

ir

$$N(x, y) = \left(\frac{\partial f}{\partial y} \right)_x. \quad (29)$$

Tačiau iš matematikos principų žinome, kad funkcijai $f(x, y)$ galioja:

$$\frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial f}{\partial x} \right)_y = \frac{\partial^2 f}{\partial y \partial x} = \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial f}{\partial y} \right)_x. \quad (30)$$

Kitais žodžiais tariant, išvestinių eilės tvarka nėra svarbi jokiai dviejų kintamųjų funkcijai. Jeigu diferencialas yra tikslusis, lygtis (26) yra teisinga.

Pavyzdys. Sakykime, kad žinome tik idealiųjų dujų visuotinio diferencialo išraišką, bet nežinome, ar jis yra tikslusis, ar netikslusis. Pritaikę tikslumo kriterijų, gauname:

$$\frac{\partial}{\partial P} \left(\frac{R}{P} \right) = -\frac{R}{P^2} = \frac{\partial}{\partial T} \left(-\frac{RT}{P^2} \right). \quad (31)$$

Taip sužinome, kad idealiųjų dujų tūris yra termodinaminė savybė.

1.1.7. Termodinaminės savybės

1.1 lentelėje surašytos pagrindinės termodinaminės savybės.

1.1 lentelė. Pagrindinės termodinaminės savybės.

Savybė	Sutrumpinimas	Pastabos
Sudėtis	$n_1, n_2, \dots$	Tiesiogiai matuojama
Mechaniniai kintamieji	P, V ir kt.	Tiesiogiai matuojami
Temperatūra	T	Tiesiogiai matuojama
Energija	U	Teorinė savybė, įeinanti į pirmąjį termodinamikos dėsni
Entropija	S	Teorinė savybė, įeinanti į antrąjį ir trečiąjį termodinamikos dėsnius
Kitos savybės	H, G, A ir kt.	Išvestinės iš aukščiau nurodytų

1.1.7.1. Entalpija

$$H = U + PV. \quad (32)$$

$$\Delta H_p = Q_p. \quad (33)$$

Entalpijos (*enthalpy*) pokytis lygus šilumos kiekiui, kai slėgis yra pastovus ir neatliekamas joks nemechaninis darbas. Entalpijos absoliučios vertės nėra žinomos, nes vidinės energijos U absoliučios vertės nėra žinomos. Vėliau mūsų naudojama „absoliučioji entalpija“ yra naudojama tik su prielaida, kad absoliučiam nulyje entalpija lygi nuliui. Griežtai kalbant ši entalpija tėra entalpijos pokytis tarp nagrinėjamos temperatūros ir absoliutaus nulio temperatūros.

1.1.7.2. Šiluminė talpa

Kūno absorbuojama šiluma (ne fazių virsmo temperatūroje) yra proporcinga temperatūros pokyčiui:

$$Q = C(T_2 - T_1). \quad (34)$$

Proporcingumo koeficientas C vadinamas šilumine talpa (*heat capacity*). Šiluminė talpa yra istoriškai prigijęs šiek tiek neteisingas terminas, išlikęs nuo tų laikų, kai buvo manoma, jog šiluma yra saugoma objekte. Šiuo metu manome, jog terminė energija saugoma objekte, o šiluma yra energija perduodama dėl temperatūros skirtumų. Šilumos kiekio diferencialas yra netikslus ir priklauso nuo kelio:

$$C = \frac{DQ}{dT}. \quad (35)$$

Pastovaus slėgio šiluminė talpa:

$$C_p = \left(\frac{DQ}{dT} \right)_p \quad (36)$$

Pastovaus tūrio šiluminė talpa:

$$C_v = \left(\frac{DQ}{dT} \right)_v \quad (37)$$

1.1.7.3. Išvestinės lygtys

$$DQ_p = dH_p. \quad (38)$$

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p. \quad (39)$$

$$DQ_v = dU_v. \quad (40)$$

$$C_v = \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_v. \quad (41)$$

1.1.7.4. Entropija

Entropija (*entropy*) yra medžiagos netvarkingumo matas. Panašiai kaip ir energijos atveju galime apskaičiuoti tik entropijos skirtumus, o ne jos absoliučią vertę.

$$dS = \frac{DQ_{grįžt}}{T}, \quad \Delta S = \Delta S_2 - \Delta S_1 = \int_1^2 dS = \int_1^2 \frac{DQ_{grįžt}}{T}. \quad (42)$$

1.1.7.5. Helmholco laisvoji energija

Helmholco laisvoji energija (Helmholco funkcija, *Helmholtz free energy*) apibrėžiama kaip:

$$A = U - TS. \quad (43)$$

Helmholco laisvoji energija yra reakcijų, vykstančių pastovaus tūrio ir temperatūros sąlygomis. Jei jos vertė neigiama, procesas vyks spontaniškai, kai tūris ir temperatūra pastovūs.

1.1.7.6. Gibso laisvoji energija

Gibso laisvoji energija (Gibso funkcija, *Gibbs free energy*) apibrėžiama kaip:

$$G = U + PV - TS = H - TS. \quad (44)$$

Gibso energija aprašo reakcijų spontaniškumą pastovios temperatūros ir slėgio salygomis. Jei jos vertė neigiama, procesas pastovaus slėgio ir temperatūros salygomis vyks spontaniškai.

Visuotinis Gibso energijos diferencialas:

$$dG = dU + PdV + VdP - TdS - SdT . \quad (45)$$

1.1.7.7. Masseu funkcija

Masseu funkcija (*Massieu function*) apibrėžiama kaip:

$$J = S - \frac{U}{T} . \quad (46)$$

1.1.7.8. Planko funkcija (*Planck function*)

Planko funkcija (*Planck function*) apibrėžiama kaip:

$$Y = -\frac{G}{T} . \quad (47)$$

1.1.7.9. Grįžtamumo taisyklė

$$\frac{\partial}{\partial T} \frac{\partial G}{\partial P} = \frac{\partial}{\partial P} \frac{\partial G}{\partial T} . \quad (48)$$

$$\left(\frac{\partial G}{\partial T} \right)_P = -S$$

$$\int_0^T SdT = -G , P = const$$

$$\left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_P = \frac{C_P}{T}$$

$$\int_0^T \frac{C_P}{T} dT = S$$

$$\left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_P = C_P$$

$$\int_0^T C_P dT = H$$

(49-54)

1.1.7.10. Išvestiniai ryšiai tarp termodinaminių funkcijų (parametrų)

Gana sudėtinga atsiminti daugybę termodinaminių parametrų tarpusavio priklausomybių. Toliau einančioje lygčių schemoje temperatūrinės išvestinės parodytos horizontaliai, o slėginės – vertikaliai. Tai turėtų padėti surasti svarbiausių parametrų tarpusavio priklausomybes.

$$\begin{array}{c}
G \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} -S \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} \frac{C_p}{T} . \\
\downarrow \begin{array}{c} \text{pagal } P \\ T=const \end{array} \quad \downarrow \begin{array}{c} \text{pagal } P \\ T=const \end{array} \\
V \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} N1 .
\end{array}$$

$$\begin{array}{c}
-Y \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } 1/T} H \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} C_p \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} \left(\frac{\partial C_p}{\partial T} \right)_p . \\
\downarrow \begin{array}{c} \text{pagal } P \\ T=const \end{array} \quad \downarrow \begin{array}{c} \text{pagal } P \\ T=const \end{array} \\
-\frac{V}{T} \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} V - T \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p .
\end{array}$$

$$\begin{array}{c}
A \xrightarrow[V=const]{\text{pagal } T} -S \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} \frac{C_p}{T} . \\
\downarrow \begin{array}{c} \text{pagal } V \\ T=const \end{array} \quad \downarrow \begin{array}{c} \text{pagal } V \\ T=const \end{array} \\
-P \xrightarrow[V=const]{\text{pagal } T} N2 .
\end{array}$$

$$-\frac{A}{T} \xrightarrow[V=const]{\text{pagal } 1/T} U \xrightarrow[V=const]{\text{pagal } T} C_V \xrightarrow[P=const]{\text{pagal } T} \left(\frac{\partial C_V}{\partial T} \right)_p .$$

1.1.7.11. Suspaudžiamumas ir plėtimosi koeficientas

Suspaudžiamumas (*compressibility*, κ), kaip ir formulėje (10):

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T . \quad (55)$$

Plėtimosi koeficientas (*expansion coefficient*, β), kaip ir formulėje (9):

$$\beta = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P . \quad (56)$$

$$\left(\frac{\partial \beta}{\partial P}\right)_T + \left(\frac{\partial \kappa}{\partial T}\right)_P = 0. \quad (57)$$

1.1.7.12. Ribos, kai temperatūra artėja prie absoliučiojo nulio

$$G_{0K} = H_{0K} - TS_{0K} = H_{0K}. \quad (58)$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} S = 0$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} C_P = 0$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} C_V = 0$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} \left(\frac{\partial S}{\partial P}\right)_T = 0 \quad (59-66)$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} \left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_T = 0$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P = 0$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V = 0$$

Absoliučiai tvarkingiems kietiesiems kristalams galioja:

$$\lim_{T \rightarrow 0} \left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P = 0$$

$$\lim_{T \rightarrow 0} \left(\frac{\partial A}{\partial T}\right)_V = 0$$

(67-68)

Apžvelgėme pagrindines klasikinės cheminės termodinamikos lygtis. Toliau jas taikysime baltymų virsmams aprašyti.

1.2. Mažųjų molekulių sąveikos termodinamika

1.2.1. Įvadas

Šiame skyriuje apžvelgsime įvairių molekulių sąveiką. Sakykime, jog mus domina, kokia entalpijos dalis išsiskiria, kai triptofano, esančio nagrinėjamame baltyme, šoninė dalis (heterociklinė žiedų sistema) pasislepia nuo vandeninės aplinkos, kai ką tik ribosomoje susintetintas baltymas susivynioja į savo natyvią konformaciją. Kitas pavyzdys, kokia yra arginino joninės grupės sąveikos su glutamino rūgšties karboksiline grupe entropija. Ar entalpija, o gal entropija stums joninę sąveiką joninių porų formavimosi link, o gal, joninės grupės norės išlikti vandenyje ir išlaikys baltymą tirpų?

Šie klausimai yra labai sudėtingi. Norėdami susidaryti bent tam tikrą vaizdą, turime išnagrinėti paprastų druskų disociacijos ir iškritimo nuosėdomis termodinamiką, taip pat įvairių hidrofobinių organinių medžiagų tirpimo termodinamiką. Tačiau kokia nauda, kad išsamiai suprasime, kaip tirpsta natrio karbonatas vandenyje? Ar galėsime šios reakcijos termodinamiką taikyti natrio jonų jungimosi prie asparagino rūgšties šoninės grandinės baltymuose termodinamikai apskaičiuoti? Apytikslis atsa-

kymas į šį klausimą – tikrai yra didelių panašumų tarp šių reakcijų termodinamikos, ir mažųjų molekulių sąveikos termodinamikos žinojimas suteikia daug informacijos apie tai, kokią dalį jos sudarys makromolekulių sąveikoje.

1.2.2. Įvadas apie vandenį

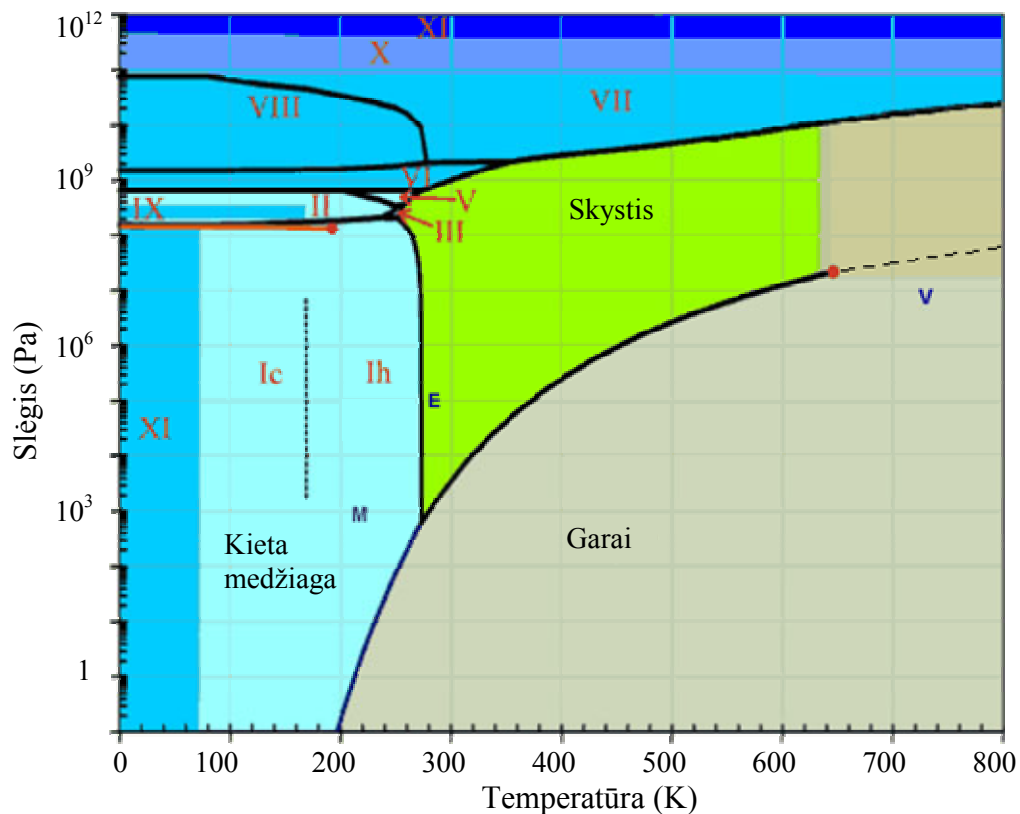
Visa gyvybė egzistuoja vandenyje. Kol kas nežinome jokių kitų gyvybės formų. Todėl šiam tirpikliui skiriamas ypatingas dėmesys. Tačiau nežiūrint didžiulės svarbos ir tyrimų gausybės, vanduo išlieka tirpikliu, kurio savybes sudėtinga paaiškinti, sudėtinga apskaičiuoti netgi jo garavimo termodinaminius parametrus. Taip pat beveik niekada neturime visiškai chemiškai gryno vandens, jame būna D_2O dalis ir daugybė įvairių priemaišų.

Svarbiausia vandens molekulės savybė, kuri lemia vandens elgesį reakcijų metu, yra tai, kad kiekviena vandens molekulė gali sudaryti iki 4 vandenilinių jungčių su savo kaimyninėmis molekulėmis. Jokia kita tokio paties dydžio molekulė negali sudaryti tiek ryšių. Šie ryšiai lemia ir labai aukštą vandens lydymosi, ir garavimo, ir kritinio taško temperatūras, taip pat didžiulę lydymosi ir garavimo entalpiją. Jau žinoma daugiau kaip 50 vandens fizikinių anomalijų, palyginti su daugeliu kitų tirpiklių.

Apie vandens fiziką ir biofiziką išsamius daugiatomius parašė mokslininkas Felix Franks. Jo daugiatomis „Water, A Comprehensive Treatise“ yra mokslo apie vandenį klasika. Tačiau ir šiuo metu kuriami vandens struktūros modeliai, kurie vis naujai paaiškina nesuprastas savybes. Įdomus ir išsamus yra vieno žymiausių šių dienų vandens specialisto profesoriaus Martin Chaplin interneto puslapis, kurį jis vis atnaujina: <http://www.lsbu.ac.uk/water/>. Greta išsamios apžvalgos, šis mokslininkas yra pateikęs naujų įdomių teorinių vandens modelių, kurie paaiškina daugelį nepaaiškintų savybių. Remdamasis jo naujausiais darbais, trumpai apžvelgsiu vandens struktūrą ir savybes, tačiau norint susidaryti išsamesnį vaizdą apie vandenį reikėtų apsilankyti šioje interneto svetainėje, nes čia pateikiu tik glaustą santrauką.

1.2.3. Vandens fazių diagrama

Vandens fazių priklausomybės nuo temperatūros ir slėgio diagrama yra gana sudėtinga (1.1 pav.). Kietos būsenos vanduo egzistuoja keliolikoje kristalinių būsenų, kai kurios jų metastabilios. Raidėmis M, E ir V pažymėtos Marso, Žemės ir Veneros paviršiaus sąlygos. Marso paviršiuje vanduo galėtų egzistuoti tik kieto, o Veneros paviršiuje – tik dujinio pavidalo. Tuo tarpu Žemėje jis gali egzistuoti ir skystos, ir kietos būsenos.



1.1 pav. Vandens fazių diagrama – fazių priklausomybė nuo temperatūros ir slėgio. Paveikslas iš <http://www.lsbu.ac.uk/water/>, autoriui sutinkant

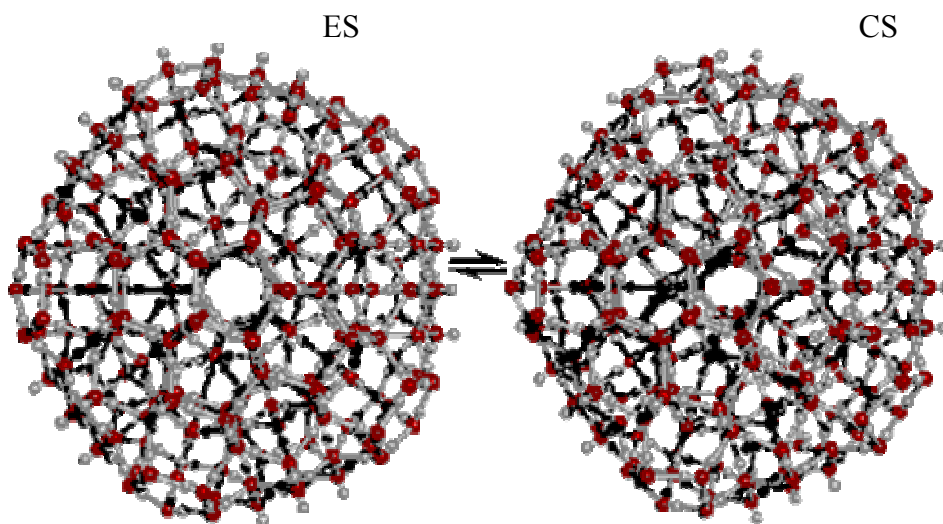
Fazė parodo medžiagos būseną, kurioje ji egzistuoja tomis sąlygomis. Kur eina linijos, koegzistuoja dvi fazės, o linijų susijungimuose, trigubuose taškuose (*triple point*) – trys fazės. Keturios linijos negali susitikti viename taške. Kritinis taškas (*critical point*) pasiekiamas, kai fazių savybės tampa nebeatskiriamos (vandens – apie 640 K ir apie 10 Mpa, galbūt vanduo turi ir antrą kritinį tašką). Raidės M, E, ir V rodo sąlygas Marso, Žemės ir Veneros planetų paviršiuose. Žemėje, kai slėgis apie 100 kPa, vanduo ties 273 K pereina iš kietos (ledo) į skystą fazę, o ties 373 K – iš skystos į dujinę (vandens garus).

1.2.4. Vandens struktūrinis modelis

Kietos būsenos vandens kristalinė struktūra yra gerai žinoma, kai kiekviena vandens molekulė tetraedriniu principu sudaro vandenilines jungtis su kaimyninėmis vandens molekulėmis. Tačiau įvairių slėgių ir temperatūrų metu egzistuoja apie dešimt kitų vandens kristalinių struktūrų.

Įdomiausia suprasti, kokia yra skystos būsenos vandens struktūra. Atlikta daug įvairių fizikinių ir kompiuterinių molekulinės dinamikos simuliacinių eksperimentų, tačiau paaiškinti medžiagų tirpumus, fazines termodinamines ir kitas savybes daugeliui modelių nepavyksta. Panašu, jog tiksliausiai skysto vandens struktūrą aprašo modelis, pavaizduotas 1.2 pav. (Martin Chaplin). Pagal šį modelį, vandenyje egzistuoja ikosaedro formos, iš 280 vandens molekulių sudaryti dinamiški klasteriai, kurie iš esmės turi dvi formas – išsipūtusią (*expanded*, ES) ir susitraukusią (*collapsed*, CS). Perėjimas tarp dviejų formų nereikalauja jokių vandenilinių jungčių nutraukimo ar susiformavimo. Vienos ar kitos formos

vyravimas, esant tam tikroms temperatūroms ir pridėtoms medžiagoms, paaiškina daugelį savybių, pvz., tankio priklausomybę nuo temperatūros ar kai kurių medžiagų tirpumus – ES struktūros centre susiformuoja gana didelė tuščia ertmė, kurioje telpa nedidelės molekulės nesuardydamos vandenilinių jungčių.



1.2 pav. Skystos fazės vandens struktūrinis modelis (iš <http://www.lsbu.ac.uk/water/>, autoriui sutinkant). Vanduo egzistuoja dviejų struktūrų, sudarytų iš 280 molekulių, ES ir CS. Šių struktūrų koegzistavimas paaiškina daugelį vandens savybių

1.2.5. Vandens anomalijos

Jei vandens savybes lygintume su daugeliu įprastų skysčių savybių, tai pastebėtume, jog daugelis vandens savybių drastiškai skiriasi nuo daugumos skysčių savybių. Tačiau kai kurios anomalijos gali pasirodyti nelabai anomališkos, jei lygintume su kai kuriais panašiais į vandenį skysčiais, kurie irgi yra netipiški. Tačiau vanduo turi daugiausiai ir labiausiai ryškių anomalijų. Žemiau surašiau šias anomalijas, remdamasis M. Chaplin interneto puslapiu (<http://www.lsbu.ac.uk/water/>). Jos visos yra M. Chaplin išsamiai paaiškintos. Čia pateikiu tik jų sąrašą.

1.2.5.1. Vandens fazių anomalijos

1. Vandens lydymosi temperatūra yra neįprastai aukšta.
2. Vandens virimo temperatūra neįprastai aukšta.
3. Vandens kritinis taškas yra neįprastai aukštas.
4. Kietas vanduo egzistuoja daugelyje įvairių stabilų ir metastabilų kristalinių bei amorfinių būsenų.
5. Ledo terminis laidumas mažėja didinant slėgį.
6. Skysto vandens struktūra kinta esant aukštam slėgiui.
7. Peršaldytas vanduo turi dvi fazes ir antrąjį kritinį tašką ties apie $-91\text{ }^{\circ}\text{C}$.
8. Skystas vanduo lengvai peršaldomas, bet sunkiai stiklėja.
9. Skystas vanduo egzistuoja esant labai žemoms temperatūroms ir užšąla kaitinant.
10. Skystas vanduo gali būti lengvai perkaitinamas.

11. Karštas vanduo gali užšalti greičiau negu šaltas (Mpemba reiškiny).

12. Šiltas vanduo vibruoja ilgiau negu šaltas.

1.2.5.2. Vandens tankio anomalijos

1. Ledo tankis didėja kaitinant (iki 70 K).
2. Vandens tūris mažėja lydantis.
3. Slėgis mažina ledo lydymosi temperatūrą.
4. Skystas vanduo turi didelį tankį, kuris didėja kaitinant (iki 3,984 °C).
5. Slėgis mažina tankio maksimumo temperatūrą.
6. Peršaldyto vandens tankis turi minimumą.
7. Vanduo turi mažą terminio plėtimosi koeficientą.
8. Vandens terminis plėtimasis mažėja (tampa neigiamas) esant žemoms temperatūroms.
9. Vandens terminis plėtimasis didėja kylant slėgiui.
10. Artimiausių kaimynų skaičius didėja lydantis.
11. Artimiausių kaimynų skaičius didėja didėjant temperatūrai.
12. Vandens suspaudžiamumas yra ypatingai mažas.
13. Suspaudžiamumas mažėja, kai temperatūra didėja iki 46,5 °C.
14. Suspaudžiamumo ir temperatūros priklausomybė turi maksimumą.
15. Garso sklaidimo greitis vandenyje didėja keliant temperatūrą iki 74 °C.
16. Garso greitis galbūt turi minimumą.
17. „Greitasis garsas“ nustatomas pasiekus aukštus dažnius, kai yra pertrūkis, esant aukštam slėgiui.
18. MBR sukinio relaksacijos laikas yra labai mažas esant mažoms temperatūroms.
19. Vandens refrakcinis indeksas turi maksimumą šiek tiek žemiau už 0 °C.
20. Tūrio pokytis, kai skystis virsta garu, yra labai didelis.

1.2.5.3. Vandens medžiaginės anomalijos

1. Joks vandeninis tirpalas nėra idealus.
2. D₂O ir T₂O fizikinės savybės labai skiriasi nuo H₂O.
3. Skysto D₂O ir T₂O fazinės savybės labai skiriasi.
4. Tirpiniai skirtingai veikia tokias savybes kaip tankį ir klampumą.
5. Napolinių dujų tirpumas vandenyje mažėja, krintant temperatūrai, pasiekia minimumą ir ima didėti.
6. Vandens dielektrinė konstanta yra didelė.
7. Dielektrinės konstantos temperatūrinė priklausomybė turi minimumą.
8. Protonų ir hidroksido jonų mobilumas yra anomaliai didelis elektriniame lauke.
9. Vandens elektrinis laidumas didėja ir pasiekia maksimumą apie 230 °C.

10. Silpnų rūgščių disociacijos konstantos turi temperatūrinį minimumą.
11. Rentgeno spinduliuotės difrakcijos vaizdas yra neįprastai išsamus.
12. Didinant slėgį, vandens molekulės tolsta viena nuo kitos.

1.2.5.4. Vandens termodinaminės anomalijos

1. Vandens lydymosi šilumos temperatūrinė priklausomybė turi maksimumą ties $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Vandens specifinė šiluminė talpa yra daugiau nei dvigubai didesnė negu ledo ar garo.
3. Specifinė šiluminė talpa (C_P ir C_V) yra neįprastai didelė.
4. Specifinė šiluminė talpa C_P turi minimumą apie $36\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Specifinė šiluminė talpa C_P turi maksimumą apie $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Specifinė šiluminė talpa C_P turi slėgio minimumą.
7. Šiluminė talpa C_V turi maksimumą.
8. Didelė vandens garavimo šiluma.
9. Didelė vandens sublimacijos šiluma.
10. Didelė garavimo entropija.
11. Vandens terminis laidumas yra didelis, didėja ir pasiekia maksimumą ties apie $130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.5.5. Vandens fizikinės anomalijos

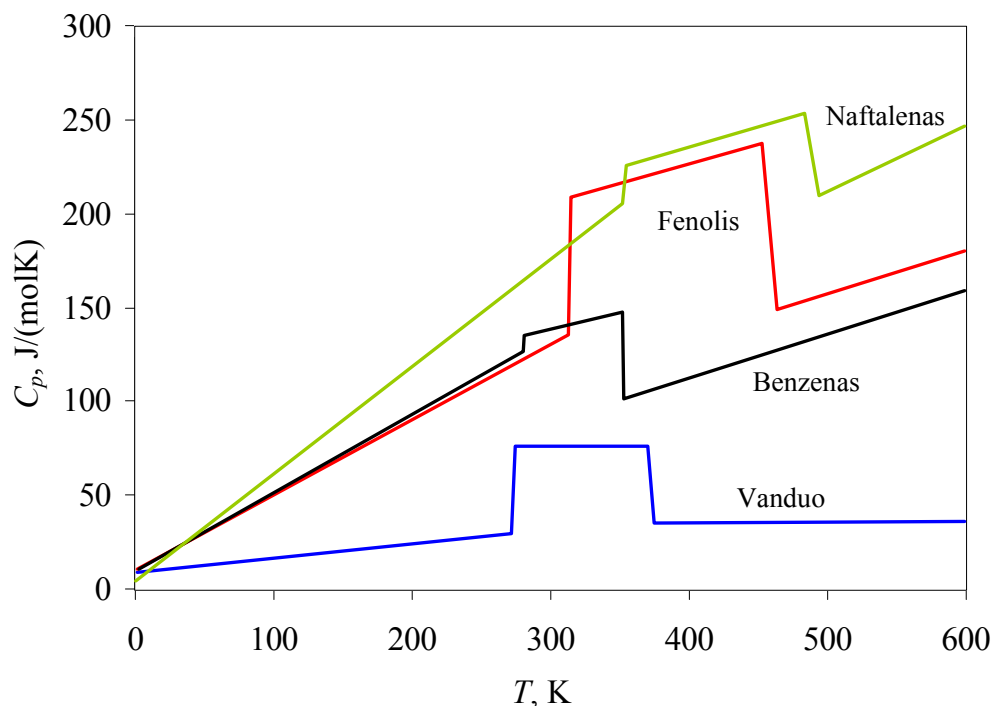
1. Vandens klampumas neįprastai didelis.
2. Klampumas labai padidėja mažinant temperatūrą.
3. Vandens klampumas mažėja didinant slėgį, kai temperatūra mažesnė nei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$.
4. Difuzija labai sumažėja mažinant temperatūrą.
5. Esant žemai temperatūrai, vandens savidifuzija didėja, didėjant tankiui ir slėgiui.
6. Terminis difuziškumas didėja ir pasiekia maksimumą apie $0,8\text{ GPa}$.
7. Vanduo turi neįprastai didelį paviršiaus įtempį.
8. Kai kurios druskos suteikia paviršiaus įtempimo koncentracinį minimumą (Jones-Ray reiškinys).
9. Kai kurios druskos panaikina mažų burbuliukų koalescenciją.

Visų nurodytų anomalijų išsamus paaiškinimas pateiktas minėtame interneto puslapyje. Matome, kad anomalijų labai daug, visos jos nulemtos tarpmolekulinių vandenilinių jungčių.

1.2.6. Cheminių junginių termodinaminės savybės

Apžvelgsime kai kurias cheminių junginių termodinamines savybes ir anomalijas.

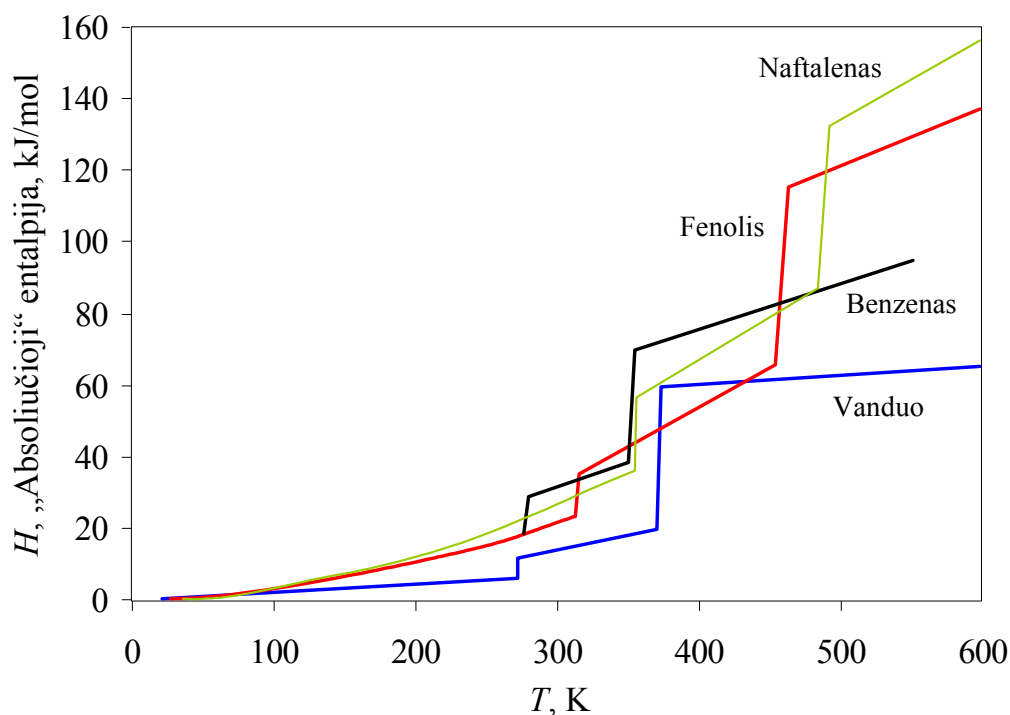
1.3 pav. parodyta tam tikrų medžiagų specifinės šiluminės talpos priklausomybė nuo temperatūros.



1.3 pav. Kelių medžiagų specifinės šiluminės talpos priklausomybė nuo temperatūros

Matome du perėjimus, sukeltus fazinių virsmų – lydantis medžiagai, šiluminė talpa staigiai didėja, o garuojant staigiai mažėja. Apskaičiuota apytiksliai, kas 10 °C, remiantis žinyno [2] lygtimis. Pasiekus absoliutųjį nulį, šiluminė talpa lygi 0, o perėjimuose kreivės turi būti vertikalios.

Integruodami šiluminės talpos priklausomybę nuo temperatūros, gauname entalpijos priklausomybę nuo temperatūros. Darome prielaidą, kuri nėra įprasta ir priimta fizikinės chemijos, jog entalpija esant nulinio K temperatūrai lygi nuliui. Taip pat reikia žinoti eksperimentines lydymosi ir garavimo entalpijas, pamatuotas esant garavimo ir lydymosi temperatūroms. Gauname grafikus, pavaizduotus 1.4 pav.



1.4 pav. „Absoliučiosios“ entalpijos priklausomybė nuo temperatūros

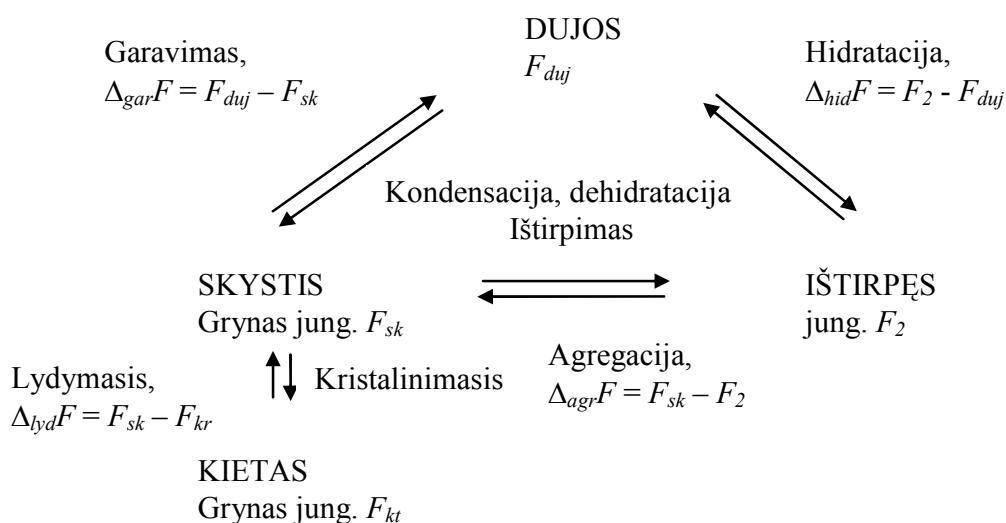
Daryta prielaida, kad, pasiekus absoliutųjį nulį, entalpija lygi nuliui, tai priklauso nuo susitarimo. Vertikalius staigius pokyčius sukelia faziniai virsmai – pirmąjį sukelia kietos būsenos lydymas, o antrąjį – skystos būsenos garavimas. Vanduo, kurio molekulinis svoris nepalyginamai mažesnis negu, pvz., benzeno, turi panašias lydymosi ir garavimo entalpijas ir panašią visą entalpijos priklausomybę nuo temperatūros.

1.2.7. Faziniai virsmai ir sąveikos energija

Sąveikos tarp molekulių stiprumą galima aprašyti fazinių virsmų energiniais parametrais. Pavyzdžiui, 1.4 pav. iš parodytos vandens entalpijos priklausomybės nuo temperatūros matome, kad vandens garavimo entalpija, esant 100 °C temperatūrai, lygi 40,657 kJ/mol (9,717 kcal/mol). Taigi, norint nutraukti vandenilines jungtis vandenyje ir išgarinti molį vandens molekulių, reikia suteikti 40,657 kJ/mol šiluminės energijos. Nežinome, kiek tiksliai vandenilinių jungčių lieka susiformavusios, todėl nežinome ir vienos jungties energijos. Jei jungčių būtų 4, kaip yra lede, tai vienos vandenilinės jungties entalpija 100 °C būtų 10,16 kJ/mol. Kambario temperatūros, 25 °C, vandens garavimo entalpija yra šiek tiek didesnė – 43,990 kJ/mol (10,514 kcal/mol). Apytiksliai nustatyta, kad kambario temperatūros vandens molekulė suformuoja apie 3,6 vandenilines jungtis, taigi vienos jų entalpija yra 12,22 kJ/mol.

Jei norime apskaičiuoti molekulių sąveikos entalpiją, tai tiksliau būtų pasinaudoti ne garavimo entalpija, bet sublimacijos entalpija, t.y. lydymosi ir garavimo entalpijų suma. Ši suma turi būti kambario temperatūros arba kitos norimos temperatūros, o ne lydymosi ar garavimo temperatūros. Vandens sublimacijos entalpija 0 °C yra lygi 51,059 kJ/mol, skysčio garavimo entalpija 0 °C yra 45,051 kJ/mol, o ledo lydymosi entalpija 0 °C yra 6,0095 kJ/mol.

1.5 pav. parodyti faziniai virsmai ir medžiagos tirpimo vandenyje termodinamika, kuri mus labiausiai domina.



1.5 pav. Lydymosi, garavimo, hidratacijos bei agregacijos procesų pusiausvyrų diagrama

Standartinės būsenos molinės termodinaminės funkcijos ($F = G, H, S, C_p$, bei kitos) parodytos ties kiekviena forma. 2 reiškia tirpinio (2 komponento) dalinę molinę termodinaminę funkciją vandenyje (1

komponentas). Ištirpusio junginio termodinaminė funkcija apskaičiuojama hipotetinio 1 molialinio tirpalo aktyvumo vieneto, lyginama su be galo praskiestu tirpalu. Termodinaminių procesų subskriptai, *lyd* – lydymosi, *gar* – garavimo, *hid* – hidratacijos, *agr* – agregacijos. Taip pat vartojami jiems atvirkštinių procesų subskriptai: *kry* – kristalinimosi, *kon* – kondensacijos, *deh* – dehidratacijos, *tir* – tirpimo.

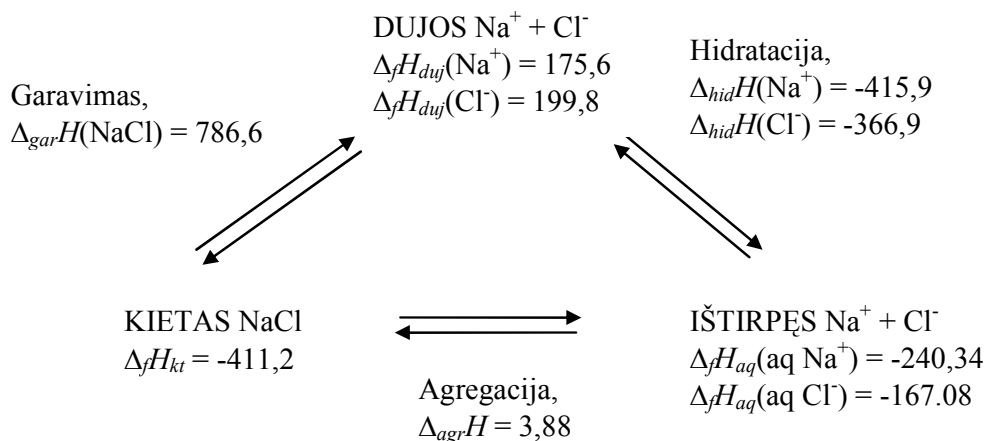
Jei norėtume palyginti, pvz., medžiagos kristalizaciją vakuume su nuosėdų susidarymu vandeniame tirpale ir taip nustatyti vandens įtaką, tai lygintume kondensacijos ir agregacijos procesų termodinaminius parametrus. Jeigu norėtume nustatyti tam tikros funkcinės grupės indėlį į bet kurį virsmą, tai lygintume panašius junginius. Pavyzdžiui, lygindami heptano garavimo entalpiją su n-heksilamino garavimo entalpija, nustatome, kiek aminogrupių sudaromos vandenilinės jungtys turi entalpijos, palyginti su vandenilinės jungties nesudarančiomis metilo grupėmis.

Panagrinėkime joninės disociacijos procesą ir išsiaiškinkime, kaip iš termodinaminių žinyų, kur parodytos tik standartinių būsenų termodinaminės funkcijos, apskaičiuoti kiekvieno proceso termodinaminius parametrus (funkcijas). Termodinaminių savybių žinyne [3] surašyti tokie su NaCl formavimusi ir tirpimu susiję termodinaminiai parametrai (1.2 lentelė).

1.2 lentelė. Standartinės ir kitų būsenų formavimosi termodinaminiai parametrai

Medžiaga	Būseną	$\Delta_f H$, kJ/mol	$\Delta_f G$, kJ/mol	S , J/(mol×K)	C_p , J/(mol×K)
Na	kr	0	0	51,30	28,15
Na	duj	107,5	-	153,72	-
Na ⁺ stand.	aq	-240,34	-261,88	58,45	46,4
Na ⁺	duj	-	-	-	-
NaCl	kr	-411,2	-384,1	72,1	50,51
Na ⁺ + Cl ⁻ stand.	aq	-407,27	-393,17	115,5	-90,0
Cl atominis	duj	121,30	-	165,19	-
Cl ⁻ stand.	aq	-167,08	-131,3	56,60	-136,4
Cl ₂	duj	0	0	233,08	33,95

Iš parametru, pateiktų 1.2 lentelėje, galime apskaičiuoti virsmų, parodytų 1.6 pav., entalpijas, taip pat ir kitus parametrus. Atkreipkime dėmesį, kad tam tikrų parametru trūksta. Jų arba matavimai netikslūs, arba tiesiog jų nėra.



1.6 pav. NaCl garavimo, hidratacijos ir tirpimo vandenyje entalpijos

Procesų entalpijos apskaičiuotos iš standartinių būsenų entalpijų, pateiktų 1.2 lentelėje. Skaičiai pateikti kJ/mol 25 °C temperatūros.

Idomu, kad NaCl garavimo (sublimacijos) entalpija (786,6 kJ/mol) yra labai panaši į ištirpusių Na⁺ bei Cl⁻ jonų dehidrataciją (415,9 + 366,9 = 782,8 kJ/mol). Šie du procesai taip tiksliai vienas kitą kompensuoja, kad NaCl, tirpdamas vandenyje, išskiria nedaug egzoterminės entalpijos.

1.3. Izoterminio titravimo kalorimetrija

1.3.1. Įvadas

Vienas svarbiausių šiuolaikinės biologijos tikslų yra suprasti molekulinis baltymų ir ligandų specifiškumo ir atpažinimo reiškinius. Baltymai gali specifiškai atpažinti ir grįžtamai prisijungti bet kurias kitas molekules – mažamolekulinius ligandus (jonus, lipidus, angliavandenius ir t.t.), makromolekules (baltymus, DNR) ar net makromolekulių kompleksus. Šias sąveikas galima apibūdinti koreliacijomis tarp funkcijos, struktūros (įskaitant dinamiką), kinetikos ir energijos (termodinamikos). Termodinaminių parametrų matavimas yra svarbus, nes biomolekulių grįžtamoji nekovalentinė sąveika apima nekovalentinių jungčių perskirstymą.

Iš visų termodinaminių parametrų lengviausia eksperimentiškai pamatuoti ligando jungimosi entalpiją, t.y. entalpijos pokytį, kuris nustatomas baltymui pereinant iš laisvos (neprijungtos) į su ligandu susijungusią būseną. Šiuo metu populiariausias ir lengviausiai atliekamas yra izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas, kuriuo tiesiogiai matuojama entalpija.

Kol nebuvo kalorimetrų, t.y. prietaisų, tiesiogiai matuojančių šiluminius pokyčius, termodinamiams parametrams, tokiems kaip entalpija ir entropija, matuoti buvo naudojami netiesioginiai (nekalorimetriniai) metodai. Tada neišvengiamai reikėjo pasikliauti teorinėmis prielaidomis ir apskaičiuoti termodinaminius parametrus. Klasikinis pavyzdys – entalpija nustatoma, remiantis van't Hoff'o analize, formulė (1), t.y. matuojama jungimosi konstantos (laisvosios Gibso energijos) priklausomybė nuo temperatūros ir apskaičiuojama entalpija:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial \frac{1}{T}} \right)_P = -\frac{\Delta H}{R}. \quad (1)$$

Visos cheminės reakcijos turi entalpijos pokytį. Todėl kalorimetriniai matavimai yra universalūs. Svarbu šiuos entalpijos pokyčius tiksliai pamatuoti. Izoterminio titravimo kalorimetrija (*isothermal titration calorimetry*) yra vienintelis metodas, kuriuo galima tiesiogiai ir pakankamai tiksliai pamatuoti beveik bet kurio bimolekulinio proceso sąveikos entalpiją. Šiuo metodu, bent jau tarp tam tikrų ribų, galima pamatuoti taip pat ir jungimosi konstantą ir susijungiančių medžiagų stochiometriją. Jei matuojame jungimosi konstantą ir entalpiją, tai nesunkiai apskaičiuojame laisvąją Gibso energiją ir entropiją taikydami standartines termodinamikos lygtis:

$$\Delta G = -RT \ln K_b. \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3)$$

Taigi titravimo kalorimetrijos būdu vieno eksperimento metu galima nustatyti tris pagrindinius jungimosi termodinaminius parametrus – laisvąją Gibso energiją, entalpiją ir entropiją. Taip pat nesunkiai, atlikus keletą identiškų kelių temperatūrų eksperimentų, nustatyti šiluminės talpos pokytį:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_p. \quad (4)$$

1.3.2. Kalorimetrai

Iki aštuntojo dešimtmečio dauguma biokolorimetrinių matavimų buvo atliekami keliose pasaulio laboratorijose, kurios buvo pasigaminusios savo unikalius kalorimetrus. Pirmuosius komercinius kalorimetrus pagamino LKB (Švedija), dabar Thermometric AB (www.thermometric.com). Jie buvo plačiai naudojami, o naujausia šių prietaisų linija, TAM, naudojama iki šiol, matuojant ląstelių metabolizmo kinetiką bei energetiką ir baltymų bei ligandų sąveiką.

Devintojo dešimtmečio pradžioje buvo sukurti komerciniai ITC bei DSC kalorimetrai. Iš pradžių jie vadinti „izoterminiais mikrokolorimetrais“, tai apytiksliai reiškė, jog jie gali detektuoti mikrovato eilės galios pokytį izoterminėmis sąlygomis. Tačiau sąlygos tik iš dalies buvo izoterminės. Vėliau sukurti nanokolorimetrai, kurių detekcijos riba jau beveik siekė nanovatus.

Atsižvelgiant į šilumos matavimo pobūdį, kalorimetrai gali būti suskirstyti į tris pagrindines grupes: adiabatinius, šiluminio laidumo ir galios kompensacijos kalorimetrus. Idealiame adiabatiniame kalorimetre (*adiabatic calorimeter*) nėra šilumos perdavimo tarp kalorimetro kiuvečių ir aplinkos. Adiabatinės sąlygos garantuojamos dedant kalorimetro kiuvetes už „adiabatinio skydo“. Matavimo metu temperatūros pokytis tarp kiuvetės ir skydo yra 0. Šiluma, kuri sugerama arba išsiskiria adiabatiniame kalorimetre, yra lygi sandaugai tarp temperatūros pokyčio ir kalorimetro kiuvetės šiluminės talpos.

Šiluminio laidumo kalorimetruose (*heat conduction calorimeter*) išsiskyrusi arba susigėrusi šiluma keliauja iš arba į aplinkoje esančią šilumos gertuvę, pvz., aliuminio bloką. Termobaterijos (*thermopiles*), esantys tarp kiuvetės ir šilumos gertuvės, reaguoja į šilumos srauto pokyčius.

Galios kompensavimo kalorimetruose (*power compensation calorimeter*) galia, susidariusi dėl egzoterminės reakcijos, yra kompensuojama šaldant (vandeniu arba Peltje reiškiniu). Matuojant endoterminius procesus, kiuvetė gali būti šildoma elektriniu šildytuvu. Taip gali būti garantuotos praktiškai tikslios egzoterminės reakcijos sąlygos.

Dauguma šiuolaikinių izoterminių mikrokolorimetrų yra šiluminio laidumo tipo, turintys arba neturintys galios kompensavimo. Pagrindiniai gamintojai yra Calorimetry Sciences Corporation (CSC, seniau Hart Scientific, JAV, www.calorimetrysciences.com), Setaram (Prancūzija, www.setaram.com), Thermometric (Švedija, www.thermometric.com) ir Microcal (JAV, www.microcalorimetry.com).

Dauguma kalorimetrų yra sukonstruoti kaip diferenciniai kalorimetrai, t.y. kalorimetre yra dvi kiuvetės, viena, kur dedamas pavyzdys, ir kita, kuri yra lyginamoji (*reference*) kiuvetė. Matuojamas signalo skirtumas tarp dviejų kiuvečių.

Praktiškai biocheminėms reakcijoms analizuoti tinka tik dviejų kompanijų jautriausi izoterminiai titravimo kalorimetrai – VP-ITC (Microcal) ir Nano-III (CSC). Vienas eksperimentas trunka apie 1–2 valandas, terminė pusiausvyra nusistovi daug greičiau negu naudojant ankstesnius prietaisus. Pagrindinė (bazinė) linija lieka stabili bent 15 minučių ties 0,04 mikroJ/s galia, įjungus maišymą. Reakcijos gali būti praktiškai matuojamos tarp 2 – 80°C temperatūrų. Aparatai yra automatizuoti, tai labai palengvina eksperimento pradžią, o duomenys dažniausiai analizuojami Origin programa, kuri automatiškai juos apdoroja.

Keletas pagrindinių kalorimetrų modifikacijų, kurios naudojamos biologiniams tyrimams, parodytos 1.7 pav.



A- Microcal VP-ITC kalorimetras



B – CSC Nano ITC III 5300 modelio kalorimetras



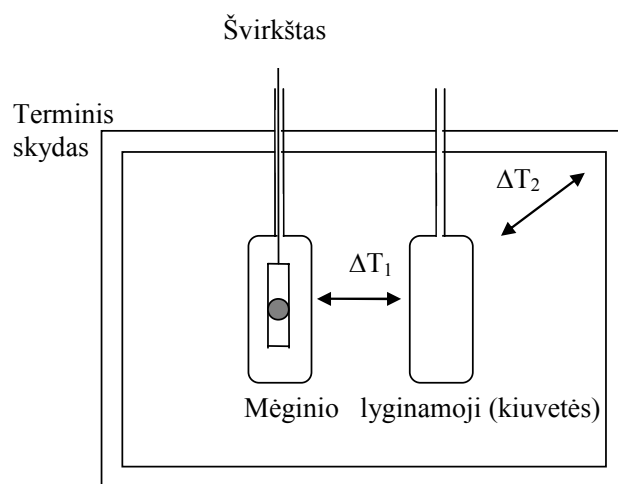
C – Microcal Auto-ITC kalorimetras robotas

1.7 pav. Pagrindiniai šiuo metu biologiniams tyrimams naudojami izoterminio titravimo kalorimetrai

1.3.3. Eksperimento pradžia, duomenų apdorojimas

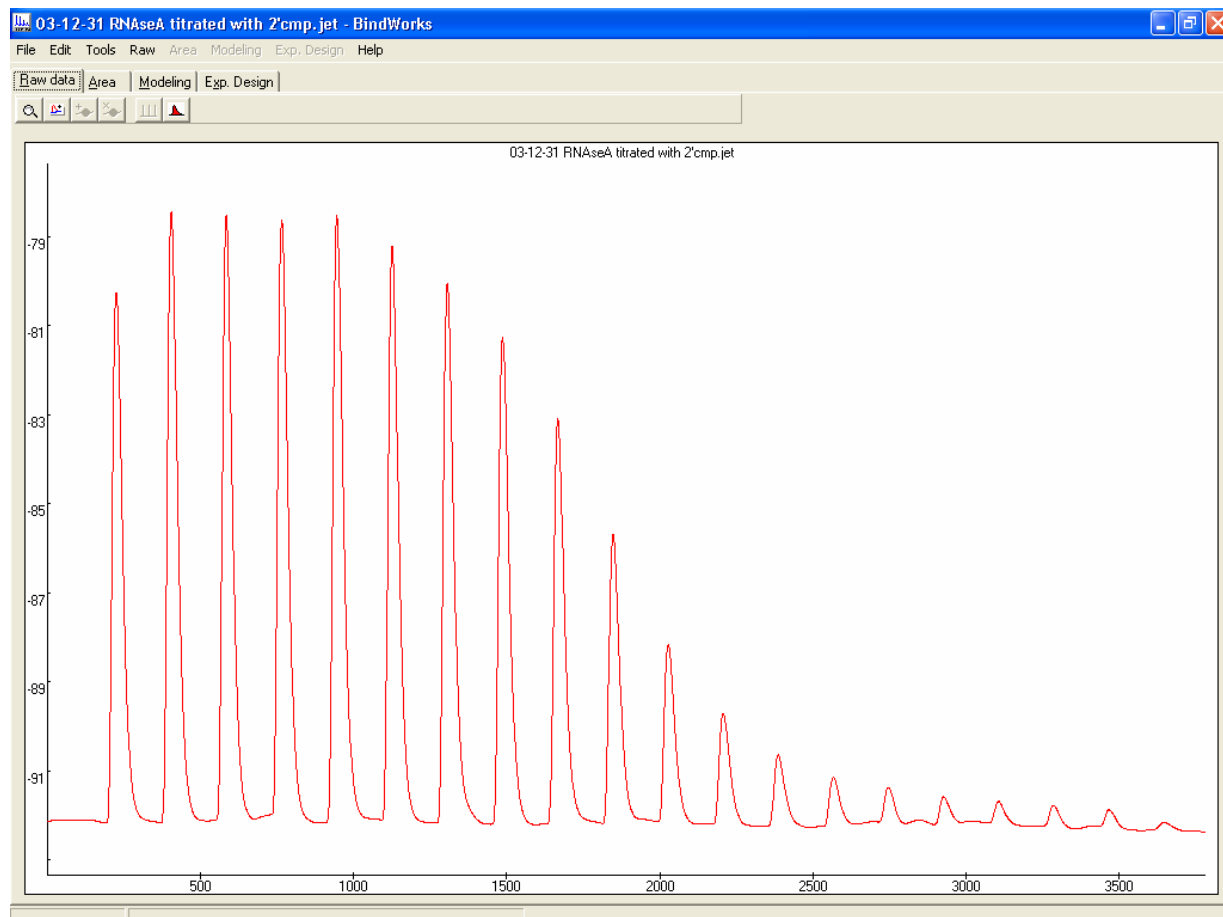
Į mėginio kiuvetę (*sample cell*) pilamas makromolekulės tirpalas, o ligandas – į švirkštą (*syringe*), kuriuo gali būti švirkščiamas įvairiomis porcijomis į kiuvetę (kartais eksperimentai atliekami ir atvirkščia seka, dedant makromolekulę į švirkštą, o ligandą – į kiuvetę). Lyginamoji kiuvetė pripildoma vandens ar buferio tirpalo. Paprastai tai neturi reikšmės, išskyrus atvejus, kai imamas didelis kiekis (1–10 proc.) organinių skysčių, pvz., DMSO ar etanolio.

Nusistovėjus šiluminei pusiausvyrai, abiejų kiuvėčių temperatūra tiksliai matuojama ir lyginama. Grįžtamasis mechanizmas per termobaterijų (*thermopile/thermocouple*) sistemą garantuoja terminę pusiausvyrą tarp kiuvėčių, t.y. mėginio kiuvetėje yra tokia pati temperatūra kaip ir lyginamojoje. Jei reakcija egzoterminė, kiuvetė šiek tiek šaldoma, o jei endoterminė, šiek tiek šildoma. Principinė izoterminio kalorimetro schema parodyta 1.8 pav.



1.8 pav. Principinė izoterminio titravimo kalorimetro schema. Parodytos mėginio ir lyginamosios kiuvetės adiabatiniame apvalkale. Matuojamų temperatūrų skirtumai tarp kiuvėčių ir aplinkos taip pat schemiškai pavaizduoti. Į mėginio kiuvetę įleidžiamas švirkštas su ligando tirpalu

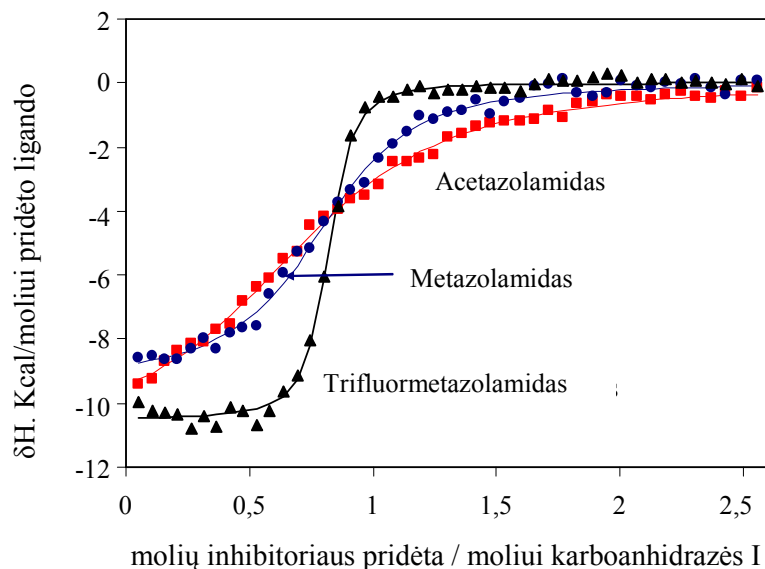
1.9 pav. parodyti tipiški pirminiai izoterminio titravimo kalorimetrijos eksperimento duomenys. Abscisių (x) ašyje atidėtas laikas sekundėmis, o ordinačių (y) ašyje – elektrinė galia, kuria reikia kaitinti ar šaldyti mėginio kiuvetę, kad temperatūra liktų izoterminė. Eksperimento pradžioje kairėje pusėje esanti pagrindinė linija nusistovi ir išlieka stabili – apie 92 μW . Apie 200-ąją sekundę daroma pirmoji ligando injekcija, ligandas jungiasi prie baltymo, išsiskiria egzoterminė šiluma, galia, kuria reikia šildyti mėginio kiuvetę, sumažėja iki maždaug 80 μW ir po maždaug 3 minučių vėl nusistovi ties pagrindine linija – visa reakcijos šiluma išsiskyrė, nusistovėjo pusiausvyra. Tada atliekama antra ir tolesnės injekcijos.



1.9 pav. Neapdoroti titravimo duomenys, gauti CSC Nano ITC III kalorimetru titruojant ribonukleazę A 2'-CMP

Eksperimentas taip suplanuotas, kad 20–50 injekcijų pusėje vyktų jungimosi reakcija, o likusioje pusėje ji nevyktų. 1.9 pav. matyti, kad pasiekus 2500 sekundes, visas baltymas jau prisotintas ligando ir naujos injekcijos nesuteikia papildomo šilumos kiekio. Paskutinės mažos smailės gali būti dėl nežymių temperatūros skirtumų ar praskiedimo poveikio.

Norėdami nustatyti išsiskyrusią reakcijos šilumą, horizontaliai pravedame pagrindinę liniją per smailių apačias ir integruojame plotus tarp parodytos kreivės ir pagrindinės linijos. Kiekvienos smailės plotai atidedami atskirame grafike (1.10 pav.). Čia parodyti jau kitos titracijos duomenys, titruojant karboanhidrazę sulfonamidiniais slopikliais.



1.10 pav. Integruoti izoterminės titravimo kalorimetrijos duomenys. Duomenys autoriaus

Fermentas karboanhidrazė I buvo titruojamas keletu ligandų (acetazolamidu, metazolamidu ir trifluorometansulfonamidu). Ženkla žymi eksperimentines duomenų smailių integruotas reikšmes, o linijos – teorinio modelio regresiją. Stipriausiai susijungiančio (trifluorometansulfonamido) kreivė stačiausia. Kreivės, parodytos 1.10 pav., yra regresuojamos, naudojant modelį, aprašantį vienos ligando molekulės jungimąsi su viena baltymo molekule.

1.3.4. 1:1 stochiometrijos modelis

Aprašome standartinę grįžtamąją reakciją:



Čia M – makromolekulė, o L – ligandas. Tada jungimosi konstanta:

$$K_b = \frac{[ML]}{[L][M]}. \quad (6)$$

Čia [ML], [L], ir [M] – makromolekulės-ligando komplekso, laisvo ligando ir laisvos makromolekulės koncentracijos pusiausvyros sąlygomis. Bendra ligando koncentracija:

$$L_t = [L] + [ML]. \quad (7)$$

Bendra makromolekulės koncentracija:

$$M_t = [ML] + [M] = [ML] + \frac{[ML]}{K_b [L]}. \quad (8)$$

(7) lygtį išsprendę, remdamiesi laisvo ligando koncentracija, ir pakeitę į (8) lygtį, ir ją pertvarę, gauname kvadratinę lygtį:

$$[ML]^2 + [ML] \left(-M_t - L_t - \frac{1}{K_b} \right) + M_t L_t = 0, \quad (9)$$

kurios vienintelis sprendinys yra:

$$[ML] = \frac{1}{2}(-b - \sqrt{b^2 - 4c}). \quad (10)$$

Čia

$$b = -X_t - M_t - \frac{1}{K_b} \quad (11)$$

ir

$$c = M_t X_t. \quad (12)$$

Integruota kalorimetrinio titravimo kreivė aprašo, kaip kinta ligando-baltymo komplekso koncentracija kintant pridėto ligando koncentracijai. Diferencijuodami ir pertvarkydami (10) lygtį, gauname:

$$\frac{d[ML]}{dX_t} = \frac{1}{2} + \frac{1 - 0,5 \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right) - \frac{y}{2}}{\sqrt{y^2 - 2y \left(1 - \frac{1}{K_b M_t}\right) + \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right)^2}}. \quad (13)$$

Čia $y = \frac{X_t}{M_t}$, t.y. ligando ir makromolekulių koncentracijų santykis titracijos metu.

Ligando-baltymo komplekso koncentracijos kitimas ($d[ML]$), padaugintas iš reakcijos molinės integralinės entalpijos ir kiuvetės tūrio (V_0), yra lygus šilumos kiekiui dQ :

$$dQ = d[ML] \times \Delta H \times V_0. \quad (14)$$

Įstatę (14) lygtį į (13) lygtį, gauname išraišką, aprašančią, kaip titravimo metu kiekvienos injekcijos išsiskyres ar sunaudotas šilumos kiekis priklauso nuo pridėto ligando kiekio, baltymo koncentracijos, reakcijos entalpijos ir kiuvetės tūrio:

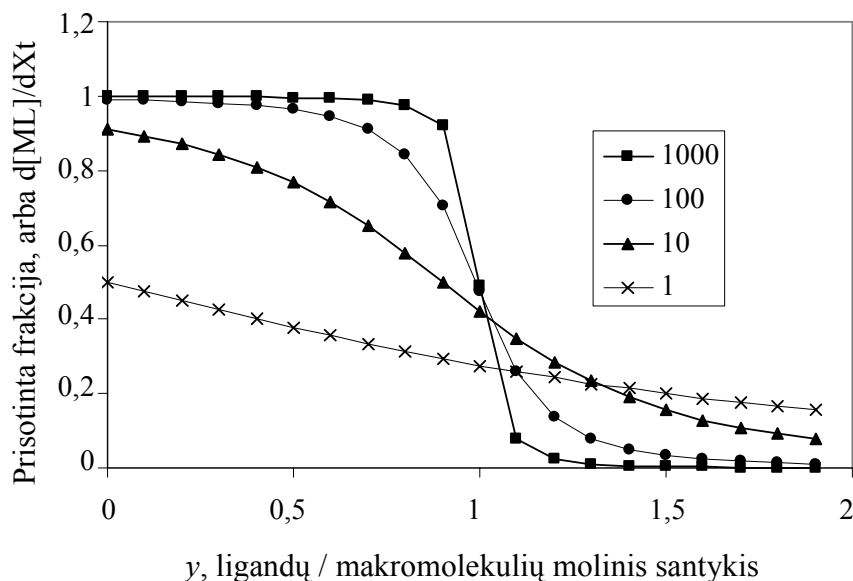
$$dQ = \Delta H \times V_0 \times \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - 0,5 \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right) - \frac{y}{2}}{\sqrt{y^2 - 2y \left(1 - \frac{1}{K_b M_t}\right) + \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right)^2}} \right). \quad (15)$$

Titravimo kalorimetrijos eksperimentų metu visus norimus parametrus galime nustatyti vienu eksperimentu tik tuo atveju, jeigu vadinamojo c faktoriaus ribos siauros. Jei jis didesnis, negalima tiksliai nustatyti jungimosi konstantos, jei jis mažesnis, tai kreivė iš viso abejotina. Faktorių c apskaičiuojame padauginę baltymo koncentraciją kiuvetėje ir jungimosi konstantą, jei ji yra žinoma:

$$c = M_t K_b. \quad (16)$$

Kokybiškos titravimo kreivės, iš kurių galima apskaičiuoti entalpiją, entropiją ir laisvąją Gibso energiją, gaunamos tik tada, jei faktorius c yra ne mažesnis nei 1 ir ne didesnis kaip 1000. Praktiškai

jis turėtų būti tarp 5 ir 500. 1.11 pav. parodytos teorinės titravimo kreivės, gautos esant įvairiems c faktoriams. Jei faktorius c labai didelis, kreivė yra labai stati ir iš jos negalima tiksliai apskaičiuoti laisvosios Gibso energijos (tuo pačiu ir jungimosi konstantos). Jei faktorius c labai nedidelis, kreivė būna gulsčia, pridėjus ligando, vyksta tik dalinis jungimasis.



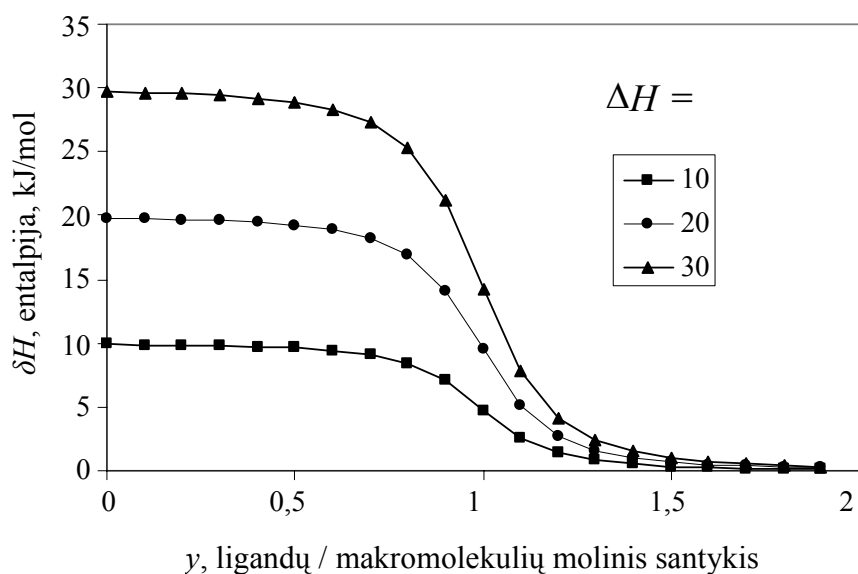
1.11 pav. Teorinės izoterminio titravimo kreivės gautos pagal formulę (13), esant įvairiems faktoriams c (16)

Planuodami eksperimentą, kai nežinome jungimosi konstantos, galime tik apytiksliai nuspėti, koks galėtų būti faktorius c . Jei dar nežinome ir stochiometrijos, tai eksperimento planavimas yra labai apytikslis ir gali nepavykti. Per pirmuosius bandymus reikėtų bandyti didesnes baltymo ir ligando koncentracijas. Tačiau reagentai dažniausiai yra brangūs, todėl praktiškai būna atvirkščiai – pradedama nuo mažesnių koncentracijų.

VP-ITC kalorimetro kiuvetės darbinis tūris būna apie 1,4 ml, o švirkšto tūris – 250 arba 100 mikrolitų. CSC Nano-ITC III kalorimetro kiuvetės tūris – apie 975 μ l, o švirkšto dažniausiai 250 μ l. Eksperimento pabaigoje ligando koncentracija turi būti maždaug dvigubai didesnė negu pradinė baltymo koncentracija. Todėl galima planuoti ligando–baltymo koncentracijas eksperimento pradžioje kaip 10:1. Tipiškas eksperimentas, kai baltymo pridedama 10 μ M, o ligando – 100 μ M. Jei jungimasis stiprus ir entalpija didelė, gali pavykti eksperimentas, kai pridedama 1 μ M baltymo į kiuvetę, o 10 μ M ligando į švirkštą. Tačiau mažinant koncentracijas, mažėja signalo ir triukšmo santykis, nes artėjama prie kalorimetro jautrumo ribos.

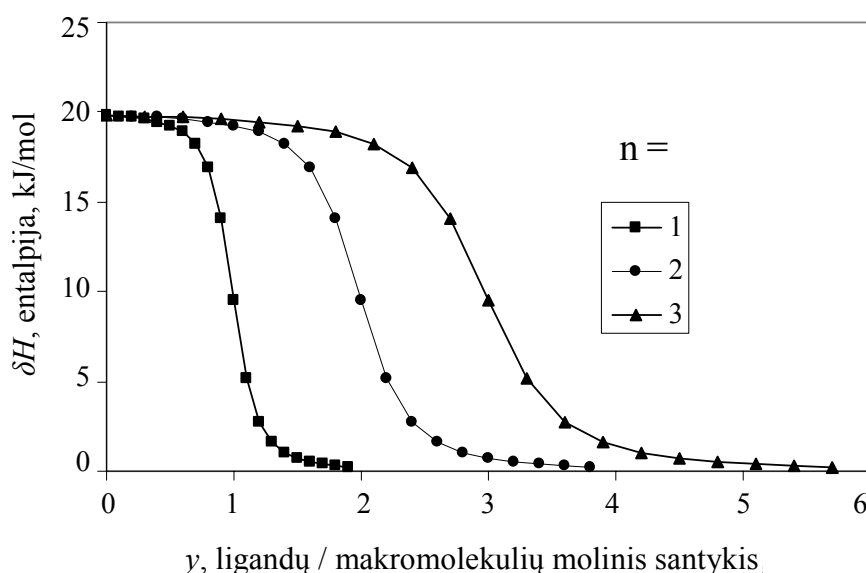
1.12 pav. parodytos tipiškos teorinės ITC kreivės, kai skiriasi integruota jungimosi entalpija (ΔH). Atkreipkite dėmesį, kad integruota entalpija praktiškai sutampa su daline entalpija (δH) titravimo pradžioje, bet tik tuo atveju, jeigu c faktorius yra didelis, daugiau kaip 100. Tačiau reikėtų nepainioti daliinių ir integruotų entalpijų. Dalinė entalpija reiškia šilumą, išsiskyrusią konkrečios injekcijos metu, ji

priklauso nuo titravimo eigos, o integruota entalpija yra reakcijos termodinaminis parametras. Ji būtų lygi plotui po grafiku 1.12 pav.



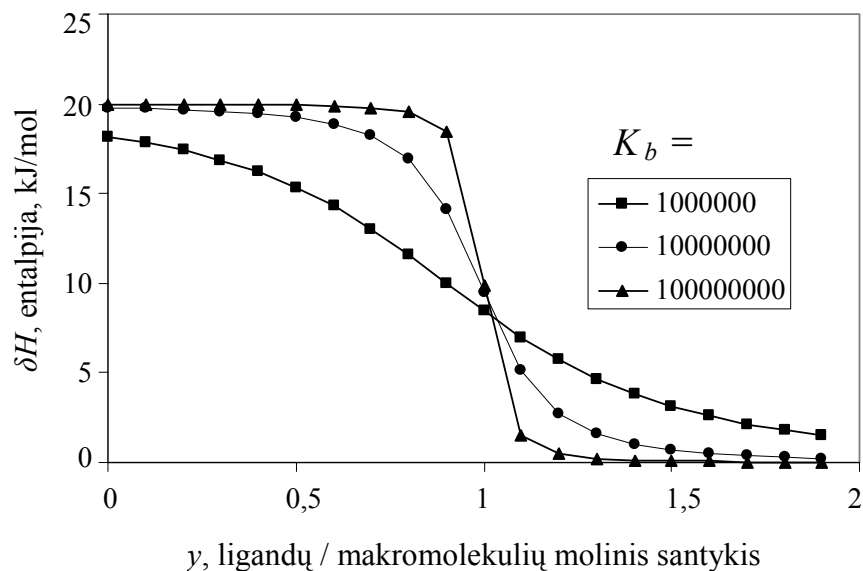
1.12 pav. Teorinės ITK kreivės esant skirtingoms integruotoms jungimosi entalpijoms

1.13 pav. parodyta ITK kreivių priklausomybė nuo reakcijos stochiometrijos n . Jeigu turime keletą identiškų ligando jungimosi vietų baltymo paviršiuje, pvz., ligando jungimasis su oligomeriniu baltymu, tada jungimosi kreivė pasislenka, tai priklauso nuo stochiometrijos. Praktiškai atlikdami ITK eksperimentus, netgi kai teorinis n lygus vienetui, gauname vertes apie 0,9 ar 0,95. Tai reiškia, kad mūsų baltymas yra šiek tiek negrynas, arba jo koncentracija kiuvetėje truputį mažesnė negu apskaičiuota. Gali būti, kad švirkšte ligando koncentracija šiek tiek didesnė negu planuota.



1.13 pav. Teorinės ITK kreivės esant skirtingoms jungimosi stochiometrijoms

1.14 pav. parodyta ITK kreivių priklausomybė nuo jungimosi konstantos. Juo jungimosi konstanta didesnė, juo statesnės titravimo kreivės. Priklausomybė yra panaši į 1.11 pav. priklausomybes.



1.14 pav. Teorinės ITK kreivės, kai baltymo koncentracija lygi 10 μM , o konstantų vertės parodytos grafike

1.3.5. Kalorimetro kalibravimas ir tikrinimas

Svarbu periodiškai kalorimetrą kalibruoti arba bent jau patikrinti jo tikslumą taikant žinomas reakcijas. Kalorimetrai kalibruojami naudojant elektrinį šilumos generavimą. Pavyzdžiui, leidžiant 10 μW galios srovę 10 sekundžių, generuojamas 100 μJ šilumos kiekis. Jei šiluma sklinda ir yra matuojama, kaip ir vykstant cheminei reakcijai, toks kalibravimas yra tikslus ir tinkamas. Tačiau naudinga patikrinti kalorimetrą taikant žinomos entalpijos reakcijas. Deja, universalių reagentų ir reakcijų nėra.

1.3 lentelėje yra keletas tipišκών reakcijų, tinkamų kalibruoti. Titruojant šarmą, svarbu pašalinti anglies dioksido priemaišas. Šarmo ir tris buferio titravimo rūgštimi protonizacijos jungimosi konstantos didelės, todėl kalibruoti užtenka kelių smailių, nebūtina visa kreivė.

1.3 lentelė. Kalorimetro tipiniai kalibravimo reagentai

Kiuvetėje	Švirkšte	Entalpija (25°C)
0,5 mM NaOH	5 mM HCl	-55,86 kJ/mol
0,5 mM TrisOH	5 mM HCl	-47,7 kJ/mol
5 mM 18-crown-6	50 mM BaCl ₂	-31.4 kJ/mol (K _b =5900 M ⁻¹)

1.3.6. Stebimų termodinaminių parametrų interpretavimas

Kalorimetrinius eksperimentus atlikti gana paprasta, tačiau gautų duomenų interpretavimas labai sudėtingas. Svarbiausias tokių eksperimentų tikslas yra suprasti, kaip biologinės ir cheminės struktūros sąveikauja, koks kiekvieno atomo ar funkcinės grupės indėlis į kiekvieną termodinaminį parametą.

Taip jau yra, kad net iš pirmo žvilgsnio pačios paprasčiausios reakcijos yra gana sudėtingos. Kai nagrinėjame nedidelio molekulinio svorio (100-500 g/mol) cheminio junginio prisijungimo prie baltymo reakciją vandeniniame tirpale konkrečiomis sąlygomis, nustatome tik vieną entalpiją, vieną entropijos pokytį ir t.t. Tačiau šį rezultatą sudaro daugybė sudėtinių reakcijų, kurių suma ir yra tokia išmatuota entalpija. Tarp sudėtinių reakcijų minėtinos:

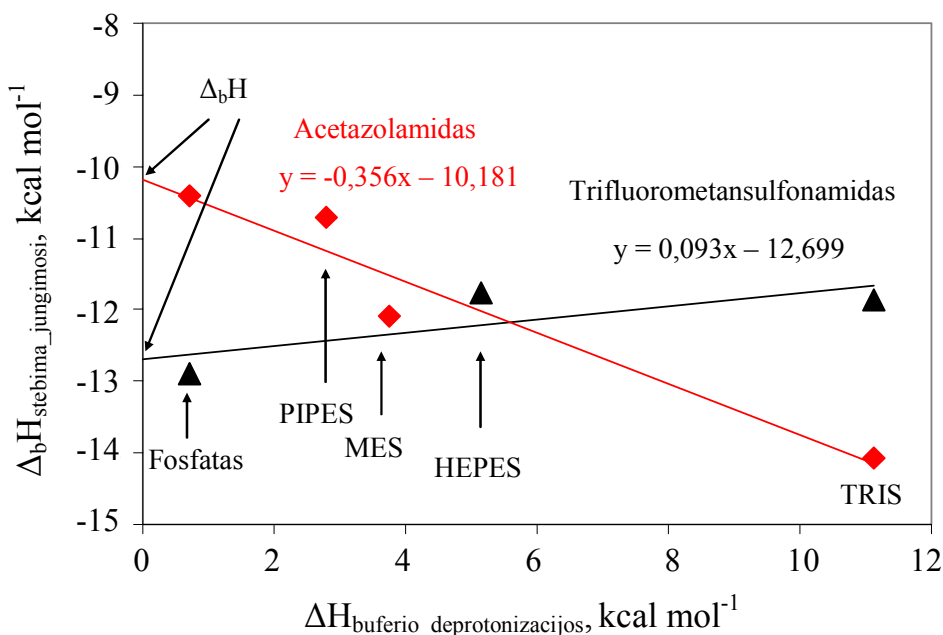
1. Ligando dalinė ar visiška desolvatacija.
2. Baltymo aktyviojo centro, kur jungiasi ligandas, desolvatacija.
3. Vandens molekulių, kurios hidratavo baltymą ir ligandą, prisijungimas vandenilinėmis jungtimis prie „bendro vandens“ (*bulk water*).
4. Ligando molekulės prisijungimas prie baltymo vandenilinėmis, hidrofobinėmis ar joninėmis jungtimis ir sąveikomis.
5. Jonų (Na^+ , Cl^- , ir ypač stambesnių, pvz., SO_4^{2-}) jungimasis ar atskilimas nuo baltymo dėl pasikeitusių jų jungimosi savybių prisijungiant ligandui.
6. Jonų jungimasis ar atskilimas nuo ligando.
7. Protonų jungimasis ar atskilimas nuo baltymo dėl pasikeitusių jonizuojančių grupių pK_a esant prijungtam ligandui.
8. Protonų jungimasis ar atskilimas nuo ligando.
9. Protonų jungimasis ar atskilimas nuo buferio.

Visas šias reakcijas norisi interpretuoti ar atskirti jų indėlius į nustatomą dydį. Tačiau praktiškai tai yra kol kas neįveiktas uždavinys. Labai sudėtinga interpretuoti pirmąsias tris reakcijas. Jų indėliai gali būti šimtus kartų didesni negu stebimi jungimosi termodinaminiai parametrai ir su priešingais ženklais, vienas kitą paslepiantys. Todėl empiriniai interpretavimai tik iš dalies paaiškina indėlių reikšmę. Dažniausia klaida, kai neatsižvelgiama į protonizacijos reiškinius (7–9). Kitame skyrelyje išsamiau panagrinėsime protonizacijos reiškinius.

1.3.7. Protonizacijos reiškinių interpretavimas

Jei atliekame titravimo kalorimetrijos eksperimentus, esant įvairiems pH , dažnai matome, jog pamatuoti termodinaminiai parametrai priklauso nuo pH . Tokių reakcijų entalpijos taip pat priklauso ir nuo to, kokiam buferiui atliekame jungimosi eksperimentą. 1.15 pav. pavaizduota dviejų ligandų jungimosi prie karboanhidrazės (hCAI) entalpijos priklausomybė nuo buferio.

Acetazolamido jungimosi entalpija fosfatiniame buferiui yra mažiau egzoterminė negu tris buferiui. Tuo tarpu trifluorometansulfonamido entalpija fosfate labiau egzoterminė negu tris buferiui. Visais atvejais pH yra tiksliai 7,0. Jei norime pašalinti buferio protonizacijos reiškinį, ekstrapoliuojame entalpijas į nulinę buferio protonizacijos entalpiją. Gauname nuo buferio nepriklausančią entalpiją $\Delta_b H$. Mūsų pavyzdyje acetazolamido jungimosi entalpija lygi -10,2 kcal/mol, o trifluorometansulfonamido -12,7 kcal/mol. Tačiau šios entalpijos dar nėra tikrosios jungimosi entalpijos. Kol kas pašalinta tik paskutinė (9) reakcija. Šios entalpijos turi indėlių iš visų kitų aštuonių reakcijų.



1.15 pav. Acetazolamido ir trifluorometansulfonamido jungimosi su žmogaus karboanhidraze I entalpijos, esant 37 °C, priklausomybė nuo buferio deprotonizacijos entalpijos

Ekstrapoliacijos polinkio kampas (1.15 pav.) yra lygus sujungtų (*linked*) protonų skaičiui n , kuris yra prijungiamas ar atskiriamas, kai ligandas jungiasi su baltymu.

$$n = \frac{\partial \Delta H_{\text{stebima}}}{\partial \Delta H_{\text{buferio protonizacijos}}} = - \frac{d(\log K_b)}{d(pH)}. \quad (17)$$

Mūsų pavyzdyje, kai acetazolamidas jungiasi su karboanhidraze, kiekviena prijungta ligando molekulė praranda 0,36 protono. Jungiantis trifluorometansulfonamidui, yra prijungiamas 0,093 protono. Aišku, protonas negali būti dalomas. Skaičiai yra mažesni už vienetą, nes pH yra artimas protonizacijos pK_a . Protonas yra prarandamas jungiantis acetazolamidui, nes jungiasi deprotonizuota ligando forma, o deprotonizacijos pK_a yra apie 7,5. Trifluorometansulfonamido deprotonizacijos pK_a yra apie 6,2, tai reiškia, kad didžioji dalis ligando jau yra deprotonizuota, kai $pH = 7,0$.

1.4 lentelė. Pagrindinių buferių jonizacijos (deprotonizacijos) pK_a ir entalpijos priklausomybė nuo temperatūros

Temperatūra	TRIS		PIPES		Fosfatas	
°C	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$, kJ/mol	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$, kJ/mol	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$, kJ/mol
0	8,98	49,25	6,98	10,96	6,92	9,79
5	8,81	48,91	6,94	11,09	6,89	8,87
10	8,65	48,53	6,90	11,17	6,86	7,91
15	8,49	48,16	6,87	11,25	6,84	6,99
20	8,34	47,82	6,83	11,34	6,82	6,07
25	8,20	47,45	6,80	11,46	6,80	5,10
30	8,06	47,07	6,77	11,55	6,79	4,18
35	7,93	46,69	6,73	11,63	6,78	3,26
40	7,81	46,36	6,70	11,72	6,77	2,30
45	7,69	45,98	6,67	11,84	6,76	1,38
50	7,57	45,61	6,64	11,92	6,76	0,46

Tempe- ratūra	TRIS		PIPES		Fosfatas	
55	7,46	45,27	6,61	12,01	6,76	-0,50
60	7,35	44,89	6,58	12,13	6,76	-1,42
65	7,25	44,52	6,56	12,22	6,77	-2,34
70	7,15	44,14	6,53	12,30	6,77	-3,31
75	7,05	43,81	6,50	12,38	6,78	-4,23
80	6,96	43,43	6,47	12,51	6,79	-5,15
85	6,87	43,05	6,45	12,59	6,80	-6,11
90	6,78	42,68	6,42	12,68	6,82	-7,03
95	6,70	42,34	6,40	12,76	6,83	-7,95
100	6,62	41,97	6,37	12,89	6,85	-8,91

Tempe- ratūra	HEPES		Acetatas		MES	
°C	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$, kJ/mol	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$, kJ/mol	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$, kJ/mol
0	7,73	19,79	4,73	3,68	6,35	15,15
5	7,66	20,04	4,72	3,05	6,29	15,23
10	7,59	20,29	4,71	2,43	6,24	15,27
15	7,53	20,50	4,71	1,76	6,19	15,36
20	7,46	20,75	4,70	1,13	6,15	15,44
25	7,40	21,00	4,70	0,50	6,10	15,52
30	7,34	21,25	4,70	-0,17	6,06	15,61
35	7,28	21,51	4,70	-0,79	6,01	15,69
40	7,22	21,76	4,70	-1,42	5,97	15,77
45	7,16	22,01	4,71	-2,05	5,93	15,86
50	7,11	22,22	4,71	-2,72	5,89	15,94
55	7,05	22,47	4,72	-3,35	5,85	16,02
60	7,00	22,72	4,73	-3,97	5,81	16,11
65	6,95	22,97	4,74	-4,64	5,77	16,15
70	6,89	23,22	4,75	-5,27	5,74	16,23
75	6,84	23,47	4,76	-5,90	5,70	16,32
80	6,79	23,72	4,78	-6,57	5,67	16,40
85	6,74	23,93	4,79	-7,20	5,63	16,48
90	6,69	24,18	4,81	-7,82	5,60	16,57
95	6,65	24,43	4,82	-8,45	5,57	16,65
100	6,60	28,40	4,84	-9,12	5,53	16,74

1.5 lentelė. Pagrindinių buferių jonizacijos (deprotonizacijos) termodinaminiai parametrai esant 25 °C.

Buferis	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$	$\Delta_{\text{dep}}C_p$	$\Delta_{\text{dep}}G$	$\Delta_{\text{dep}}S$
vienetai	-	kJ/mol	J/(K×mol)	kJ/mol	J/(K×mol)
TRIS	8,2	47,45	-73,01	46,81	2,1
BICI	6,8	27,07	2,01	38,81	-39,4
TAPS	7,0	41,51	-23,01	39,96	5,2
CAPS	7,1	48,53	29,00	40,53	26,9
PIPES	6,8	11,46	19,00	38,81	-91,7
Fosfatas	6,8	5,10	-186,98	38,81	-113,1
BES	7,0	25,19	2,01	39,96	-49,5
MOPS	7,1	21,84	38,99	40,53	-62,7
Imidazolas	7,2	36,61	-15,98	41,10	-15,1

Buferis	pK_a	$\Delta_{\text{dep}}H$	$\Delta_{\text{dep}}C_p$	$\Delta_{\text{dep}}G$	$\Delta_{\text{dep}}S$
TES	7,4	32,76	-33,01	42,24	-31,8
HEPES	7,4	21,00	48,99	42,24	-71,2
EPPS	7,9	21,55	55,98	45,09	-79,0
Trietanolaminas	7,9	33,60	47,99	45,09	-38,6
Tricine	8,0	31,97	-45,02	45,66	-45,9
Acetatas	4,7	0,50	-127,99	26,83	-88,3
Kakodilatas	6,1	-1,97	-77,99	34,82	-123,4
MES	6,1	15,52	15,98	34,82	-64,7
Glicerol-2-fosfatas	6,3	-0,08	-178,99	35,96	-120,9
ACES	6,7	31,42	-26,99	38,24	-22,9

1.3.8. Šiluminė talpa

Atliekant nepolinių angliavandenilių pernašos iš hidrofobinės į vandeninę aplinką ir baltymų susivyniojimo eksperimentus, paaiškėjo, kad šiluminės talpos pokytis (ΔC_p) koreliuoja su hidrofobinio paviršiaus plotu, kuris reakcijos metu yra paslepiamas nuo vandens, prisijungiant ligandui arba susivyniojant baltymui.

Molekulių tarpusavio paviršiaus formavimasis priklauso nuo daugybės indėlių, kurie vienas kitą slepia. Todėl, sumuojant reakcijos metu pasislepiantį paviršių ir priklausomybę nuo mažų funkcinių grupių indėlio į bendrą šiluminės talpos pokytį, indėliai dažniausiai nustatomi netiksliai, nes yra didelių šiluminės talpos nustatymo paklaidų. Todėl, pakeitus tam tikrą cheminę grupę ligando paviršiuje, galima nustatyti didelę įtaką jungimosi konstantai, bet nepastebėti indėlio į šiluminės talpos pokytį.

1.3.9. Jungimosi konstantų nustatymo intervalo padidinimas

Kaip jau minėta, titravimo kalorimetrijos praktinės konstantų nustatymo ribos yra nuo 10^3 iki 10^8 M^{-1} . Norint pamatuoti gerokai stipriau susijungiančių ligandų jungimosi konstantas, naudojamas išstūmimo metodas. Svarbu, kad būtų žinomas nagrinėjamo baltymo vidutiniškai susijungiantis konkurentinis inhibitorius.

Stipriai susijungiantis ligandas (jo jungimosi konstantos negalime nustatyti tiesiogiai) yra titruojamas į baltymo tirpalą, čia pridėta silpnai ar vidutiniškai susijungiančio ligando. Gauta kreivė apskaičiuojama įprastiniu būdu. Taip pat titruojamas baltymas su silpnuoju ligandu ir nustatomi jo jungimosi parametrai. Tada stipriai susijungiančio ligando entalpija ($\Delta_{\text{stipraus}}H$) ir jungimosi konstanta ($K_{b_stipraus}$) apskaičiuojamos:

$$\Delta H_{\text{stipraus}} = \Delta H_{\text{mišinio}} + \Delta H_{\text{silpno}} \quad (18)$$

$$K_{b_stipraus} = K_{\text{mišinio}} K_{\text{silpno}} \quad (19)$$

1.3.10. Titravimo kalorimetrijos metodo lyginimas su kitais metodais

Lygindami ITK su kitais biotermodinaminiais metodais, galime matyti šiuos metodo privalumus:

1. Jis dažnai taikomas tirti biologiškai svarbias reakcijas. Pavyzdžiui, gali būti tiriama baltymų sąveika su peptidais, kitais baltymais, lipidais, angliavandeniais, receptoriais (ir tirpiaisiais, ir prisijungusiais prie membranos), oligonukleotidais ir nukleorūgštimis. Šios sąveikos yra įdomios ir fundamentiniam mokslui, ir farmacijos praktikai. Išsamus termodinaminis sąveikų nustatymas ir lyginimas tarp sveikos ir ligos būsenos yra svarbi farmacinės intervencijos kūrimo dalis.
2. Tam tikrai baltymo-ligando sąveikai tirti galima parinkti daug parametrų, pvz., reagentų koncentraciją, temperatūrą, joninę jėgą, pH , buferio sudėtį kiekviename pH ir t.t. Taip pat svarbu naudoti įvairių druskų tipus ir koncentracijas, tiriant baltymo struktūrą, taikyti mutagenezę ir sisteminius pokyčius ligando struktūroje. Tai suteikia daug informacijos, kai reikia išsamiai išsiaiškinti tam tikros susijungiančių reagentų poros sąveikos energiją.
3. Reagentams nereikia jokių cheminių ar imobilizavimo modifikavimų, kurių reikia daugeliui kitų metodų, pvz., spektroskopiniams tyrimams ar paviršiaus plazmono rezonanso metodams. Specifinių chromoforų, kurie būtini fluorescenciniams tyrimams, nereikia kalorimetrijos atvejais, kur reagentai naudojami savo nemodifikuotos būsenos. Eksperimentas vyksta tikros pusiausvyros sąlygomis, nereikia atskirti prisijungusios ir laisvos formos, kaip daroma taikant ELISA metodus, kurie kartais naudojami jungimosi konstantoms nustatyti. Be to, ITK metodas yra neskvarbus ir nedestruktyvus. Reagentus galima po eksperimento pašalinti, matuoti jų savybes kitais metodais. Tačiau praktiškai retai pavyksta atskirti reagentus ir vėl gauti tuos pačius termodinامينius jungimosi parametrus. Be to, galima matuoti ligando jungimąsi prie jau gauto komplekso, kurio jungimasis buvo matuotas.
4. Taikant ITK metodą termodinaminiai parametrai matuojami pastovios temperatūros sąlygomis. Tokių metodų, kaip terminio poslinkio, kur temperatūra kinta, termodinaminiai parametrai yra ekstrapolijuojami į reikiamą temperatūrą. Be to, ITK yra vienintelis metodas, kur entalpija nustatoma tiesiogiai, be jokių prielaidų, o jungimosi konstanta ir entropija gali būti apskaičiuotos remiantis to paties vieno eksperimento rezultatais.
5. ITK eksperimentams netrukdo nei optinis tirpalo nepralaidumas, nei nuosėdų susidarymas eksperimento metu, nei kitos reakcijos. Tačiau interpretuodami rezultatus turime prisiminti, kad termodinaminiai parametrai yra visų eksperimento metu įvykusių reakcijų sumos rezultatas. Kaip jau minėjome, išsamus interpretavimas yra labai sudėtingas.

Tam tikri ITK trūkumai:

1. Prieš kiekvieną titravimą reikia atlikti kontrolinius eksperimentus, kurių buferis įvairus, taip galime nustatyti protonizacijos reiškinius ir juos atimti iš stebimų rezultatų. Tik tada gautoji entalpijos vertė turi tam tikrą patikimumą.

2. Stipriai sąveikaujančios medžiagos dažnai negali būti naudojamos, nes ITK naudojamos gana didelės koncentracijos (didesnės negu mikromolinės), medžiagos gali agreguoti. Tačiau kartais įmanoma parinkti tokias sąlygas, kurių metu, pakeitus pH , temperatūrą ar pan., gaunami norimi termodinaminiai parametrai, kurie po to ekstrapoliuojami į pradinės sąlygas.
3. Nors tai nėra tiesiog ITK trūkumas, tačiau mažų modelių molekulių eksperimentų rezultatai turėtų būti atsargiai taikomi makromolekulėms. Bandant nustatyti jėgas, lemiančias biomolekulių elgesį, ir koreliuojant energiją su struktūra, matyti, jog dauguma nekovalentinių reakcijų yra dar labai prastai apibūdintos ir paaiškintos. Tam tikrų sąveikų ne tik energijos dydis, bet ir ženklas yra ginčytini.
4. Payginti su daugeliu kitų spektroskopinių metodų ar terminiu poslinkiu, ITK sunaudoja gana daug medžiagos. Ligandų jungimosi konstantas galima nustatyti terminio poslinkio metodu apie 100 kartų greičiau ir sunaudojant apie 100 kartų mažiau medžiagos negu reikia ITK. Kartais tai būna neįveikiama kliūtis. Tačiau terminio poslinkio metodu nustatoma tik jungimosi konstanta, o ne entalpija ir entropija.

1.3.11. IC₅₀ modelis

Dažnai literatūra nurodo modelius, kur jungimosi konstanta yra pateikiama kitais būdais. Pavyzdžiui, IC₅₀ yra fermentinio aktyvumo inhibicijos (slopinimo) parametras, parodantis, kokios slopinklio koncentracijos atvejais lygiai 50 proc. fermentinio aktyvumo yra inhibuota (slopinta). Matuojant cheminių junginių toksiškumą, yra naudojamas LD₅₀ parametras, kuris reiškia mirtiną dozę (*lethal dose*), t. y. tokią junginio koncentraciją, kuriai esant miršta 50 proc. tiriamųjų organizmų. Tokio tipo parametrus aprašome 1:1 jungimosi modeliu, čia nurodoma prisijungusios frakcijos f_b priklausomybę nuo jungimosi konstantos (K_b), bendros pridėto ligando (L_t) ir baltymo (P_t) koncentracijų.

Prisimename modelio priklausomybes su 1:1 stochiometrija. Jungimosi konstanta lygi:

$$K_b = \frac{P_b}{L_f P_f}. \quad (20)$$

Išreiškiame ligandą prisijungusio baltymo koncentraciją:

$$P_b = K_b L_f P_f. \quad (21)$$

Bendra baltymo koncentracija lygi prisijungusio ir laisvo baltymo koncentracijų sumai:

$$P_t = P_f + P_b. \quad (22)$$

Ligando bendra koncentracija lygi:

$$L_t = L_f + L_b. \quad (23)$$

Prisijungusio ligando koncentraciją galime pakeisti prisijungusio baltymo koncentracija, jos yra lygios (nes vienas jungiasi su vienu):

$$P_b = L_b . \quad (24)$$

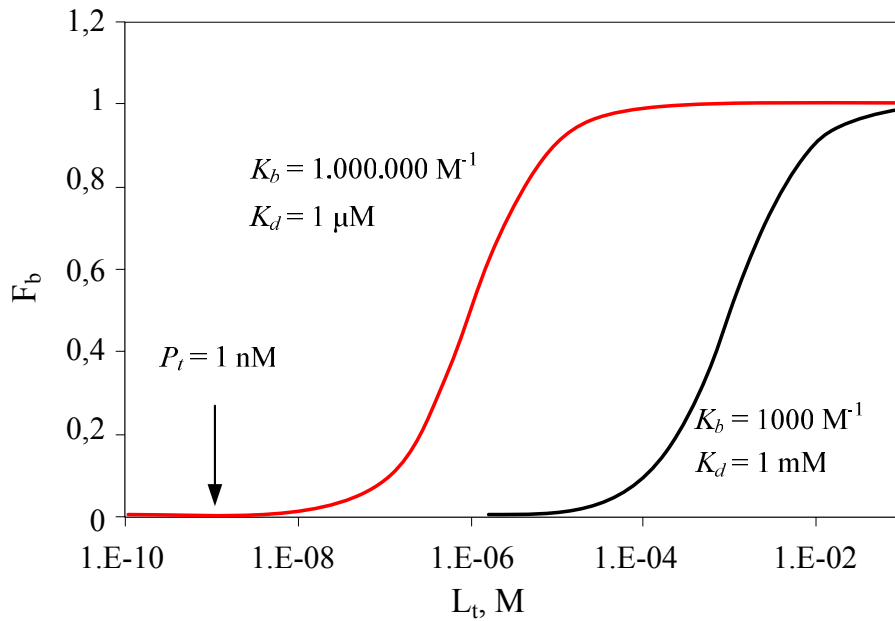
Tada apibrėžiame prisijungusią frakciją kaip prisijungusio ir bendro baltymo koncentracijų santykį:

$$f_b = \frac{P_b}{P_t} = \frac{K_b L_t P_t}{P_t} = \frac{K_b (L_t - P_b)(P_t - P_b)}{P_t} . \quad (25)$$

Išsprendžiame lygtį, kad neliktų prisijungusio baltymo koncentracijos, ir gauname galutinę ieškomą priklausomybę:

$$f_b = \frac{P_t + K_b L_t P_t + K_b P_t^2 - \sqrt{(P_t + K_b L_t P_t + K_b P_t^2)^2 - 4 K_b^2 P_t^3 L_t}}{2 K_b P_t^2} . \quad (26)$$

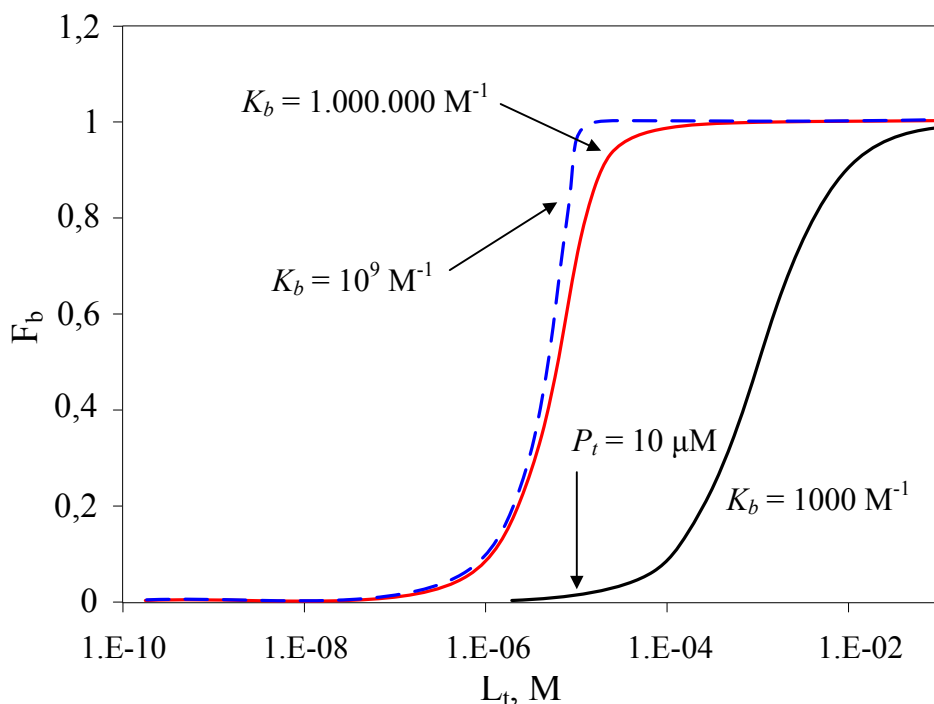
Remdamiesi šia formule ir atidėję prisotintos frakcijos priklausomybę nuo pridėtos ligando koncentracijos, gauname 1.16 ir 1.17 pav. pavaizduotas kreives.



1.16 pav. Prisotintos ligandu baltymo frakcijos priklausomybė nuo pridėtos ligando koncentracijos, esant įvairioms baltymo koncentracijoms ir jungimosi konstantoms

1.16 pav. parodytos standartinės kreivės, kurių vidurio taško (kai sočioji ar inhibuota frakcija yra lygi 50 proc.) ligando koncentracija yra lygi IC_{50} ar LD_{50} . Tačiau praktiškai atliekant tokio tipo eksperimentus, fermento koncentracija dažnai yra gerokai didesnė negu 1 nM. Tais atvejais, kai fermento koncentracija yra didesnė ar artima disociacijos konstantos vertei, gauname iškreiptą kreivę, kurios vidurio taškas jau nesutampa su IC_{50} . Pavyzdžiui, 1.17 pav. vidurinė kreivė žymi situaciją, kai $K_d = 1 \mu M$, o $P_t = 10 \mu M$. Kreivės vidurio taškas yra arčiau 10 μM , o ne 1 μM . Labai ryškus skirtumas, kai disociacijos konstanta lygi 1 nM. Tokia kreivė atrodo labiau kaip 10 μM disociacijos konstantą turinti kreivė. Tiek ligando reikia prisotinti baltymą, nors jungimasis labai stiprus. Todėl, nustatant jungimosi

parametrus, svarbu žinoti tikslią baltymo koncentraciją ir nepamiršti, kad jos vertė riboja nustatomos jungimosi konstantos apatinę ribą.



1.17 pav. Prisotintos ligandu baltymo frakcijos priklausomybė nuo pridėtos ligando koncentracijos, esant 1 μM ir 1 nM disociacijos konstantoms, kai baltymo koncentracija – 10 μM . Jei disociacijos konstanta gerokai mažesnė negu baltymo koncentracija, tiksliai pamatuoti jungimosi parametrų negalime. Punktyrinė kreivė yra panašesnė į 10 μM , negu į 1 nM K_d

1.4. Baltymų denatūracijos termodinaminis modelis

Nagrinėjame baltymą, kuris egzistuoja dviejų būsenų – natyvos (N) ir denatūruotos (išsivyniojusios, *unfolded*, U), tarp kurių yra grįžtamoji pusiausvyra:



Šios pusiausvyros konstanta yra:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]}. \quad (2)$$

Čia $[U]$ ir $[N]$ yra pusiausvyrosios abiejų baltymo formų koncentracijos. Baltymo išsivyniojimo laisvoji Gibso energija yra:

$$\Delta_U G = -RT \ln K_U. \quad (3)$$

Čia R yra universalioji dujų konstanta ($= 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ arba $1,9872 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Baltymo denatūracijos laisvoji Gibso energija gali būti išreikšta denatūracijos termodinaminiais parametrais – entalpija ($\Delta_u H$), entropija ($\Delta_u S$), bei šilumine talpa ($\Delta_u C_p$):

$$\Delta_u G = \Delta_u H - T \Delta_u S. \quad (4)$$

Entalpija ir entropija priklauso nuo temperatūros, todėl jos išreiškiamos per priklausomybę nuo šiluminės talpos, kuri pagal prielaidą yra nuo temperatūros nepriklausomas dydis:

$$\Delta_u G = \Delta_u H_{T_r} + \Delta_u C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_u S_{T_r} + \Delta_u C_p \ln \left(\frac{T}{T_r} \right) \right). \quad (5)$$

Čia T_r yra lyginamoji pasirinkta temperatūra, kai termodinaminiai parametrai (entropija ($\Delta_u S_{T_r}$) ir entalpija ($\Delta_u H_{T_r}$)) yra žinomi.

Kai temperatūra yra lygi baltymo denatūracijos temperatūrai T_m , denatūracijos pusiausvyros konstanta lygi 1, o laisvoji Gibso energija lygi 0. Tuo atveju galioja:

$$\Delta_u H_{T_m} = T \Delta_u S_{T_r}. \quad (6)$$

Tada galima rašyti (5) lygtį, pašalinant entropiją:

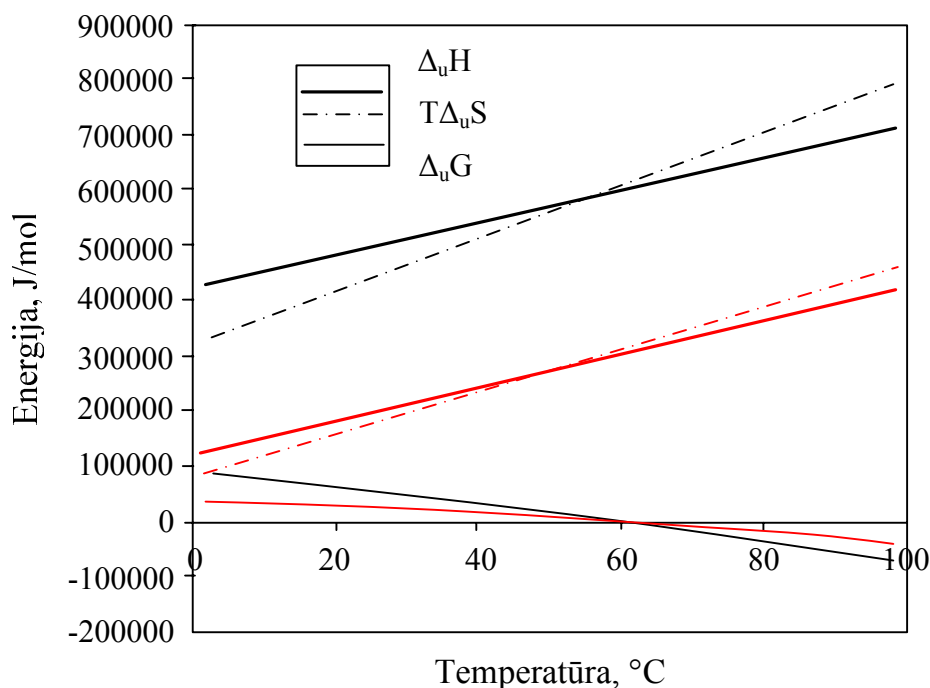
$$\Delta_u G = \Delta_u H_{T_m} \left(1 - \frac{1}{T_m} \right) + \Delta_u C_p \left(T \left(1 - \ln \frac{T}{T_m} \right) - T_r \right). \quad (7)$$

Tikimybė, kad baltymas bus natyvios būsenos, esant temperatūrai T , yra:

$$P_N = \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}}. \quad (8)$$

Tikimybė, kad baltymas bus denatūruotos būsenos, esant temperatūrai T , yra:

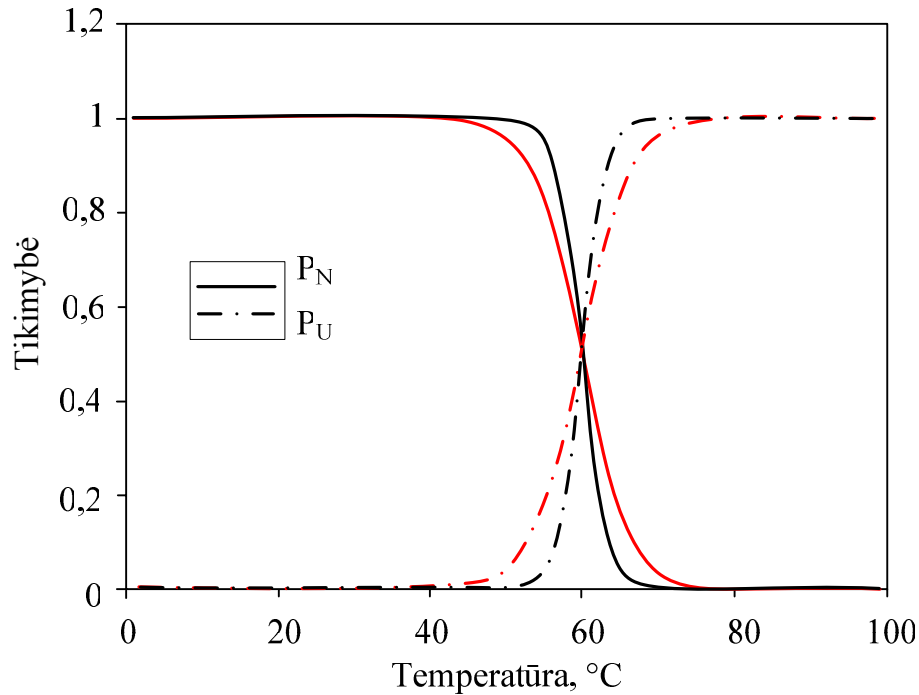
$$P_U = 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}}. \quad (9)$$



1.18 pav. Dviejų baltymų (pažymėta juodai ir raudonai) termodinaminių parametrų priklausomybės nuo temperatūros

Panagrinėkime tipiškas baltymo denatūracijos parametrų priklausomybes nuo temperatūros. 1.18 pav. parodytos dviejų tipiškų baltymų termodinaminių parametrų teorinės priklausomybės nuo temperatūros. Pasirinkti termodinaminiai parametrai:

$$\Delta_u H_{T_m}(1) = 600 \text{ kJ/mol}, \Delta_u H_{T_m}(2) = 300 \text{ kJ/mol}, T_m(1) = T_m(2) = 60^\circ\text{C}, \Delta_u C_p = 3 \text{ kJ/mol}.$$



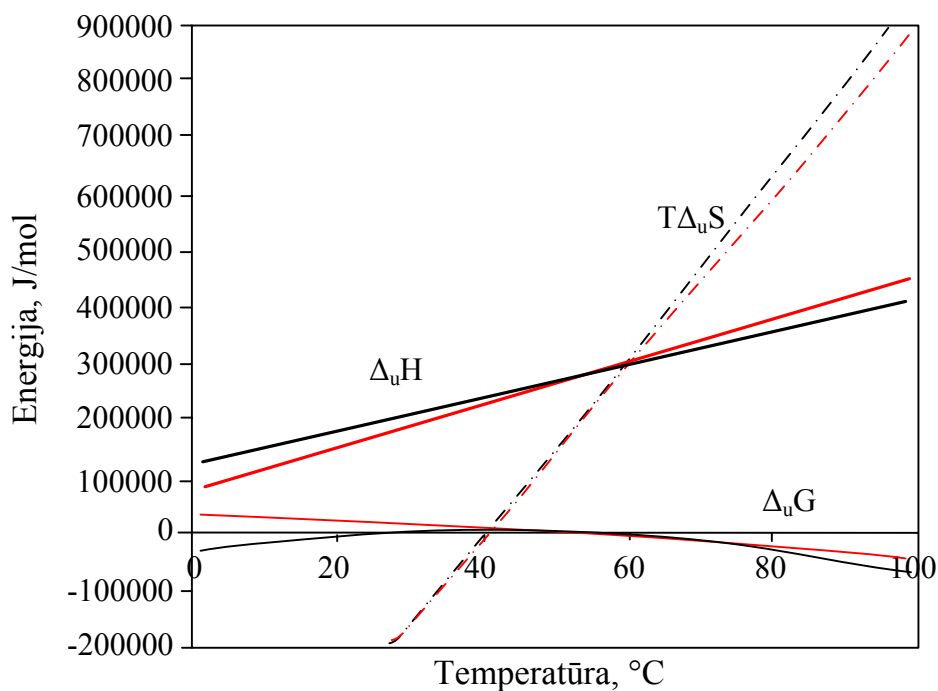
1.19 pav. Tų pačių baltymų (kaip 1.18 pav.) tikimybės būti natyvios ir denatūruotos būsenos.

Kai denatūracijos entalpija didesnė (baltymas 1), denatūracijos profilis (1.19 pav.) yra statesnis, virsmas labiau kooperatyvus.

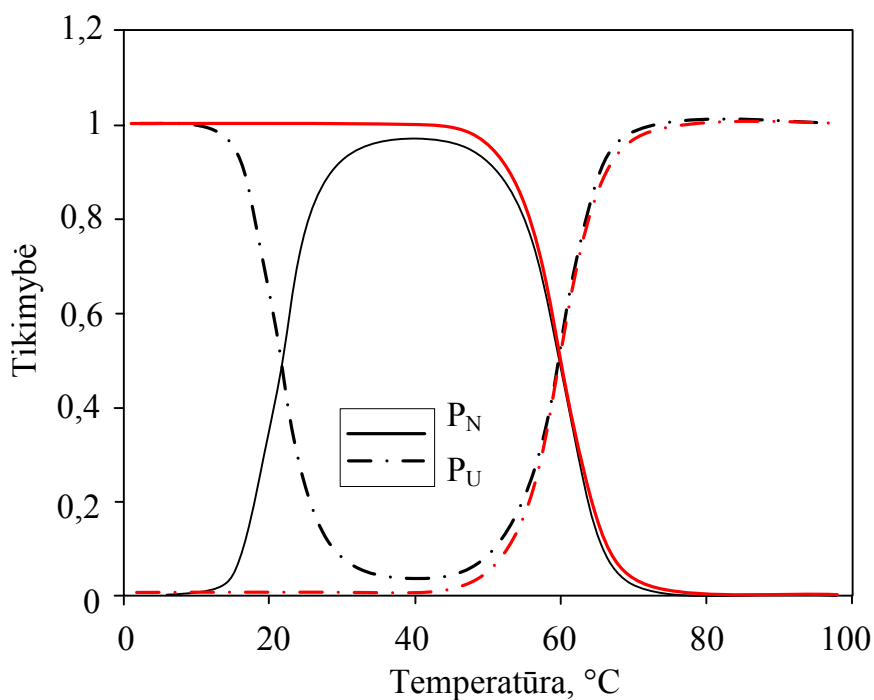
Dabar panagrinėkime priklausomybę nuo šiluminės talpos. Pasirenkame termodinaminius parametrus:

$$\Delta_u H_{T_m}(1) = \Delta_u H_{T_m}(2) = 300 \text{ kJ/mol}, T_m(1) = T_m(2) = 60^\circ\text{C}, \Delta_u C_p(1) = 3 \text{ kJ/mol}, \Delta_u C_p(2) = 15 \text{ kJ/mol}$$

Matome, kad abiejų baltymų entalpijos ir entropijos sutampa ties 60 °C, o laisvoji Gibso energija lygi 0.



1.20 pav. Dviejų baltymų denatūracijos parametrų priklausomybės nuo temperatūros Antrasis baltymas (juoda spalva) turi šalčio denatūracijos temperatūrą apie 20 °C



1.21 pav. Tų pačių baltymų tikimybės būti natyvios ir denatūruotos būsenos. Baltymas, kurio šiluminė talpa lygi 15 kJ/mol, yra gana nestabilus ir turi šalčio denatūracijos tašką apie 20 °C

Jeigu nedarome prielaidos, kad šiluminė talpa nepriklauso nuo temperatūros, tai entalpijas ir entropijas skaičiuojame integruodami:

$$\Delta_u H = \Delta_u H_{T_r} + \int_{T_r}^T \Delta C_p dT . \quad (10)$$

$$\Delta_u S = \Delta_u S_{T_r} + \int_{T_r}^T \left(\frac{\Delta_u C_p}{T} \right) dT. \quad (11)$$

Baltymų išsivyniojimo proceso atveju galima padaryti prielaidą, kad šiluminė talpa tam tikrame intervale nepriklauso nuo temperatūros. Tada gauname jau apytiksles integruotas lygtis:

$$\Delta_u H \cong \Delta_u H_{T_r} + \Delta_u C_p (T - T_r). \quad (12)$$

$$\Delta_u S \cong \Delta_u S_{T_r} + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_r}. \quad (13)$$

Iš jų jau gauname formulę (5).

Daugelis baltymų denatūracijos nustatymo metodų nustato denatūracijos priklausomybę nuo temperatūros, kaip parodyta 1.19 pav. Pavyzdžiui, terminio poslinkio (TP) metodas nusako fluorescencijos priklausomybę nuo temperatūros. Staigus fluorescencijos pakilimas lydi baltymo denatūraciją. Išsamiai metodas aprašytas skyrelyje „Terminio poslinkio metodas“.

Tirdami baltymo denatūraciją cirkuliacinio dichroizmo (CD) metodu, nustatome signalo kitimą priklausomai nuo temperatūros, kai baltymas denatūruoja. Šio metodo neaprašome knygoje, nes jis išsamiai aprašytas daugelyje literatūros šaltinių, o jo taikymas gana ribotas, palyginti su mūsų aprašytais metodais.

Kai atliekame diferencinės skenavimo kalorimetrijos (DSC) eksperimentą, gauname ne integruotą signalą, kaip CD ar TP atvejais, bet diferencijuotą, remiantis temperatūra. Procedūra bus aprašyta diferencinės žvalgos (skenavimo) kalorimetrijos skyriuje.

1.5. Diferencinė žvalgos (skenavimo) kalorimetrija

1.5.1. Įvadas

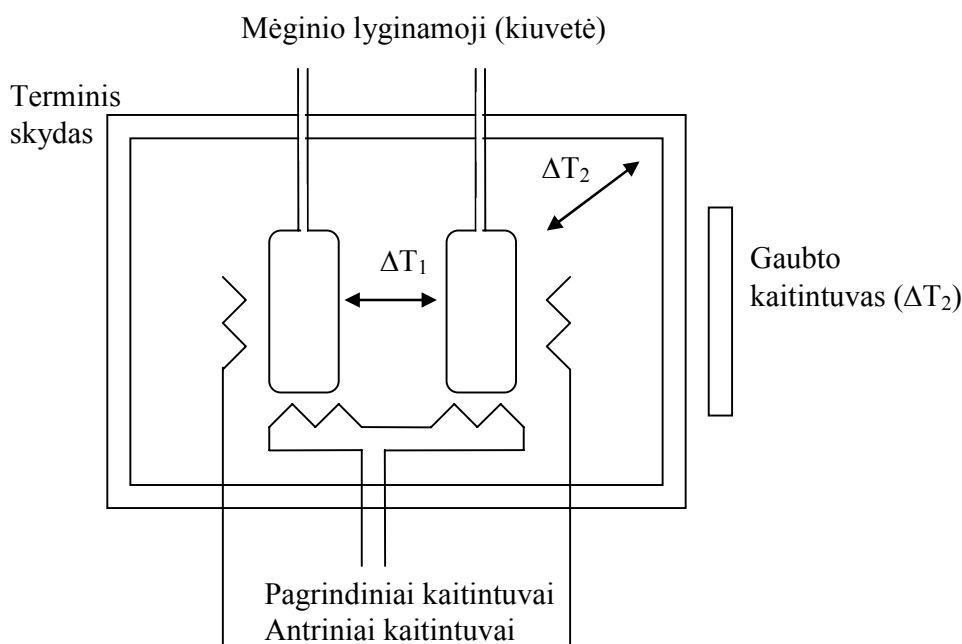
Diferencinė žvalgos kalorimetrija (*differential scanning calorimetry*, DSC) yra eksperimentinis metodas, kuriuo matuojame, kiek energijos reikia mėginiui, vykstant kontroliuojamam temperatūros didėjimui (arba mažėjimui). Šis metodas gali būti taikomas nustatyti terminių perėjimų (tranzicijų) temperatūras mėginių, kurie yra tirpale kieti, skysti arba fazių mišiniai (suspensijos). Tačiau kai padidėjo aparatūros tikslumas ir jautrumas, šis metodas buvo pradėtas naudoti nustatyti temperatūros sukeltų virsmų absoliučius termodinaminius parametrus. Šiuo metu jau sukurti pakankamai jautrūs, stabiliai veikiantys DSC mikrokolorimetrai, kuriuos biofizikiniai chemikai naudoja makromolekulių konformacijoms ir sąveikoms tirpale tirti, imdami praktiškai pasiekiamos koncentracijos tirpalus. Temperatūros perėjimus veikia ligandų jungimasis, todėl šis metodas gali būti taikomas baltymų ir ligandų jungimuisi tirti.

Šis skyrius aprašo DSC teoriją ir pateikia praktinių pavyzdžių, kaip ji taikoma, nagrinėjami jos privalumai ir trūkumai. Pabrėžiu, kad DSC yra gana netiesioginis būdas baltymų ir ligandų sąveikai

nustatyti. Tačiau ji turi ir tam tikrų privalumų, palyginti su terminio poslinkio ir izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais.

1.5.2. DSC pagrindai

Tipiška DSC instrumento schema pavaizduota 1.22 pav. Žvalgos kalorimetrijos eksperimento metu baltymo tirpalas (apie 1 mg/ml), esantis mėginio kiuvetėje, yra kaitinamas pastoviu greičiu kartu su lyginamąja kiuvete, kur įpiltas tapatus mėginiui buferio tirpalas be baltymo. Šiluminės energijos absorbavimo skirtumai tarp mėginio ir lyginamosios kiuvetės, palaikant tokią pačią temperatūrą abiejose kiuvetėse, yra lygus stebimos šiluminės talpos skirtumams. Šis šiluminės talpos skirtumas suteikia tiesioginę informaciją apie mėginyje vykstančius terminius procesus.



1.22 pav. Tipiško DSC aparato schema

Temperatūros kėlimo metu pagrindiniai kaitintuvai kaitina kiuvetes ir kelia temperatūrą pastoviu greičiu. Tuo pačiu metu stebimas temperatūros skirtumas tarp kiuvėčių (ΔT_1) ir tarp kiuvėčių ir adiabatinio gaubto (ΔT_2). Kaitinimas per gaubto kaitintuvą įgalina terminio skydo temperatūrą kilti tuo pačiu greičiu kaip ir kiuvėčių, o antriniai kaitintuvai prie kiuvėčių kompensuoja temperatūrų skirtumus tarp kiuvėčių eksperimento metu.

1.5.3. DSC kalorimetrai

DSC kalorimetrai yra senesni už titravimo kalorimetrus. Dažnai labiau žinomi yra senesnių modelių, mažiau jautrūs kalorimetrai. Čia nagrinėsime tik pačius jautriausius ir tiksliausius kalorimetrus, kurie sukurti Privalovo ir Brandts tyrėjų grupių: Microcal kompanijos (JAV, www.microcal.com) gaminami MC2, MCS ir VP-DSC, taip pat Calorimetry Sciences Corp. kompanijos (JAV, www.calorimetrysciences.com) gaminami CSC Nano II DSC, bei DASM-4 modelis, gaminamas Biologinės instrumentacijos biure Rusijoje. Šių kompanijų naujausios kartos instrumentai turi panašias

jautrumo ir tikslumo savybes, tačiau skiriasi jų kiuvečių konfigūracija ir duomenų analizės programos. Šiek tiek mažiau jautrius prietaisus gamina Setaram (Prancūzija, www.setaram.com). Jų privalumas – yra daugiau kiuvečių variantų, tinkamų įvairiems tikslams.

2 pav. parodyti naujausi DSC kalorimetrai.



6300 Nano DSC III modelis, gaminamas Calorimetry Sciences Corp., JAV



6100 Nano DSC II modelis, gaminamas Calorimetry Sciences Corp., JAV



VP-DSC kalorimetras, gaminamas Microcal Inc., JAV



1.23 pav. Naujausių DSC kalorimetrų pavyzdžiai

Automatizuotas kapiliarinis DSC kalorimetras gaminamas Microcal Inc. JAV. Kapiliarinis modelis sumažina nuosėdų įtaką duomenų kokybei. Tuo pačiu mažėja sunaudotas baltymo kiekis. Automatizacija įgalina be priežiūros išplauti ir tiksliai pripildyti kiuvetes, atlikti apie 50 eksperimentų be operatoriaus įsikišimo.

1.5.4. DSC eksperimentas

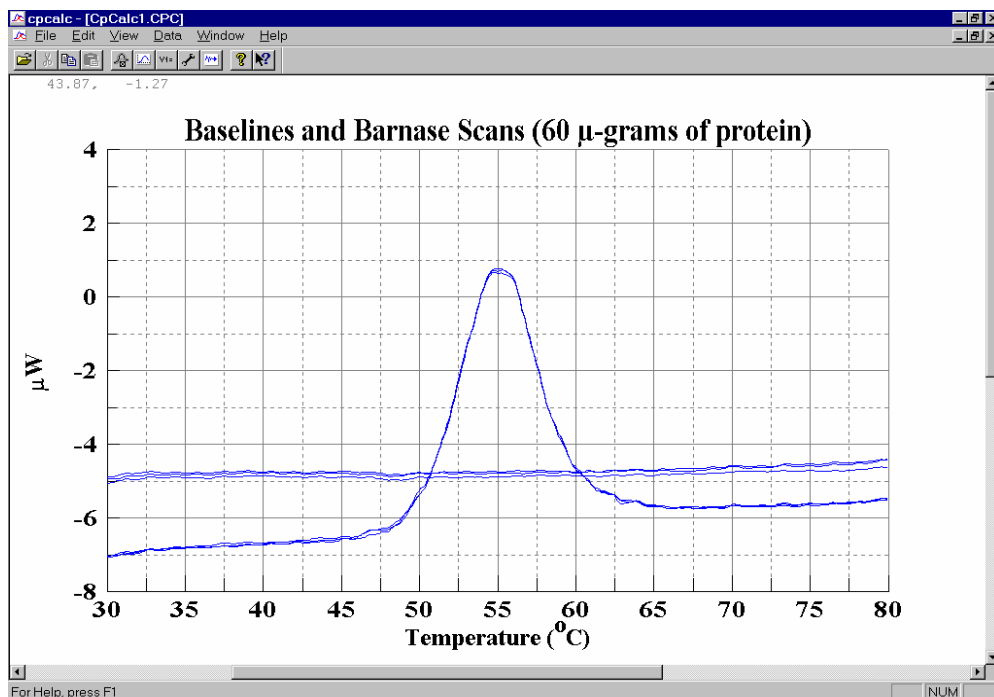
Paruošiamas baltymo tirpalas, dializuojamas prieš buferį, kuris bus naudojamas lyginamojoje kiuvetėje. Tipiškai vienam bandymui reikia 2 ml apie 1 mg/ml koncentracijos baltymo (pvz., lizocimo). Po dializės nustatome baltymo koncentraciją spektrofotometriškai. Prieš pat eksperimentą pašaliname dujas iš mėginio dalies (taikydami ne per daug mažą slėgį ir ne per stipriai maišydami, kad nedematūruotų baltymas).

Pripildome mėginio ir pavyzdžio kiuvetes tuo pačiu dializės buferiu be baltymo ir atliekame keletą eksperimentų. Jų metu nustatome pagrindines linijas 20–100 °C intervale. Kaitiname tipiškai 60 °C/val. greičiu. Leidžiame kiuvetėms ataušti ir pripildome mėginio kiuvetę baltymo tirpalo. Kartojame DSC eksperimentą tomis pačiomis sąlygomis. Kartais kartojame nekeisdami tirpalo, norėdami nustatyti, ar denatūracija buvo grįžtamoji. Po paskutinio ataušimo mėginį išimame ir spektrofotometriškai matuojame, ar yra agregatų. Jei jų daug, jie destabilizuoja potranzicinę pagrindinę liniją. Svarbu kalorimetro kiuvetę gerai išplauti stipriais detergentais ir šarmu, kad agregatai nepriliptų prie sienelių. Toliau gautus duomenis analizuojame gamintojo pateiktomis duomenų analizės programomis.

1.5.5. DSC duomenų analizė

Tipiškas DSC eksperimento rezultatas parodytas 1.24 pav. Baltymas barnazė buvo termiškai skenuojamas Nano DSC III kalorimetre. Matome keletą kartotinių pagrindinių linijų ties maždaug -5 μW galia ir keletą kartotinių eksperimentų su baltymu, kurio ikitranzitinė ir potranzitinė pagrindinės linijos yra žemiau, nei tais atvejais, kai nėra baltymo, ir yra didelė smailė, kurios vidurys apie 55 °C.

Termogramoje parodyta perteklinės šiluminės talpos (C_p , mėginys atėmus lyginamąjį) priklausomybė nuo temperatūros. Paprasta globulinio baltymo termograma susidaro iš trijų sričių – ikitranzitinės pagrindinės linijos, endoterminio denatūracijos piko ir potranzitinės pagrindinės linijos. 1.24 pav. y ašyje yra μW, nes duomenys nenormalizuoti, remiantis baltymo koncentracija. Normalizavus juos galima atidėti y ašyje perteklinę šiluminę talpą.



1.24 pav. Tipiško DSC eksperimento rezultatas – termograma. Buferis sudaro horizontalią pagrindinę liniją, barnazės baltymo denatūracijos metu matyti didelė smailė

Termogramos grafiko pradžioje, kol dar neprasidėjo baltymo denatūracija, matome, jog tirpalo, turinčio baltymo, šiluminė talpa yra mažesnė negu vandens. Priežastis – baltymas išstūmė šiek tiek vandens, o vandens šiluminė talpa yra gerokai didesnė negu daugelio organinių medžiagų, tarp jų ir baltymo. Atėmus 1.24 pav. duomenis, kai nėra baltymo, iš duomenų, kai yra baltymas, gautume šiluminę talpą, kuri yra neigiama. Daugelio baltymų ikitranzitinė pagrindinė linija turi teigiamą nuokrypį, t.y. šiluminė talpa palengva didėja, didėjant temperatūrai. Tai yra būdinga daugelio organinių medžiagų savybė. Baltymui denatūruojant, šiluminė talpa didėja, nes daugiau šilumos sugerama denatūracijos metu. Smailės temperatūra yra apytiksliai lygi baltymo denatūracijos temperatūrai T_m . Potranzitinė pagrindinė linija parodo denatūravusio baltymo šiluminę talpą. Paprastai ji yra aukščiau negu nedenatūravusio baltymo, o nuokrypio kampas mažesnis negu nedenatūravusio. Panašiai vyksta ir naudojant organinius skysčius. Taigi baltymo denatūracija yra panašus procesas į hidrofobinių medžiagų kristalų lydymąsi, kai jie suspenduoti vandenyje.

Kalorimetrinė denatūracijos entalpija (ΔH_{cal}) yra lygi integruotam smailės plotui. Jei teisingai pasirinkta pagrindinė linija, iki kurios integruojama, tada tas plotas yra lygus šiluminei energijai, kurios reikia baltymui denatūruoti. Šis šilumos kiekis priklauso nuo mėginio tūrio kiuvetėje ir iš esmės yra objektyviai pamatuotas dydis, nepriklausantis nuo pasirinkto modelio. Kaip taisyklė, denatūracijos smailės yra endoterminės, t.y. šiluma yra sunaudojama. Kartais yra egzoterminių smailių. Tai dažnai reiškia, kad vyrauja agregacija ir vyksta nespecifinis procesas, sukeltas temperatūros pakėlimo.

Van't Hoff'o entalpija (ΔH_{vH}) yra denatūracijos entalpijos dydis, gautas pasirinkus denatūracijos modelį ir generavus kreivę, kuri parodo šį modelį. Entalpija apskaičiuojama remiantis van't Hoffo lygtimi. Šiuo būdu nustatant entalpiją, naudojamas tas pats būdas, kaip ir taikant CD ar fluorescencinius

metodus. Nereikia informacijos apie mėginį, jo koncentracijos ir t.t. Entalpija nustatoma atsižvelgiant į denatūruotos frakcijos priklausomybę nuo temperatūros. Abiem metodais nustatytos entalpijos reikšmės turi sutapti, jei teisingai pasirinktas modelis ir reakcija yra gerai suprasta.

Nustatant kalorimetrinę entalpiją, būtina tiksliai žinoti natyvaus nedenaatūravusio baltymo koncentraciją eksperimento pradžioje. Geriausias būdas nustatyti baltymo koncentraciją yra UV spektras 240–400 nm srityje. Tai parodo, jog gali būti agregatų.

Paprastai DSC eksperimentai atliekami 60 °C/val. greičiu. Teoriškai grįžtamojo proceso metu termograma neturėtų priklausyti nuo žvalgos (skenavimo) greičio. Tačiau praktiškai yra negrįžtamumo, agregacijos, ar kitų ne visai grįžtamųjų, kinetiškai nulemtų procesų, todėl termogramos priklauso nuo žvalgos greičio. Svarbu pakartoti DSC eksperimentus skirtingu žvalgos greičiu, kad įsitikintume, ar ši problema svarbi konkrečios situacijos metu.

1.5.6. Pagrindinės linijos pasirinkimas

DSC eksperimentų metu svarbu tiksliai pasirinkti pagrindinę liniją, nes nuo to priklauso duomenų tikslumas. Pagrindinės linijos yra dvejopos – instrumento pagrindinė linija ir mėginio pagrindinė linija. 1.25 pav. pavaizduota horizontali linija be smailės yra instrumento pagrindinė linija. Ji gali kisti aparatui šylant, todėl verta eksperimentą pradžioje kelis kartus pakartoti be baltymo, po to be pertraukos eilinio ciklo metu įpilti baltymo tirpalo.

Mėginio pagrindinės linijos parinkimas yra gerokai sudėtingesnė problema. Denatūracijos metu pagrindinė linija pasislenka, todėl potranzitinė pagrindinė linija nėra to pačio aukščio, kaip ikitranzitinė. Kaip jau minėta, pasislinkimas yra lygus baltymo denatūracijos šiluminės talpos pokyčiui. Sudėtinga tiksliai parinkti, kaip pagrindinė linija išsidėsčiusi po denatūracijos piko. Galimi keli variantai – linijinis sujungimas, laiptas ties perėjimo viduriu, kubinis, ar ekstrapoliuotas progresinis perėjimas. Tiksliausias yra progresinis perėjimas, kurį naudojant šiluminė talpa skaičiuojama proporcingai natyvaus ir denatūruoto baltymo apskaičiuotiems kiekiams.

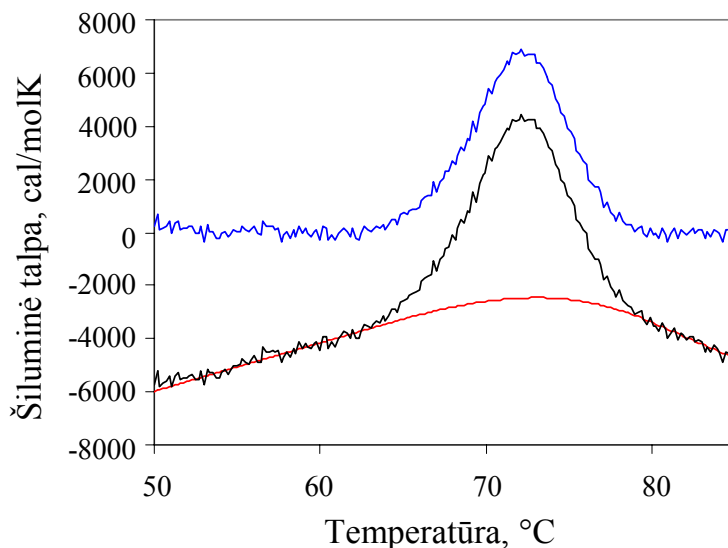
Kitas etapas analizuojant duomenis, prieš integruojant smailę, yra atimama pagrindinė linija. Vis dėlto duomenys yra šiek tiek iškraipomi. Tačiau praktiškai, kai yra geros kokybės duomenys, didesnę paklaidą sukelia instrumento pagrindinės linijos nestabilumas ir koncentracijos sukeltos nustatymo paklaidos. Tada integruojama smailė, kurios plotas virš pagrindinės linijos yra lygus molinei denatūracijos entalpijai.

1.5.7. DSC duomenų analizė ir interpretavimas

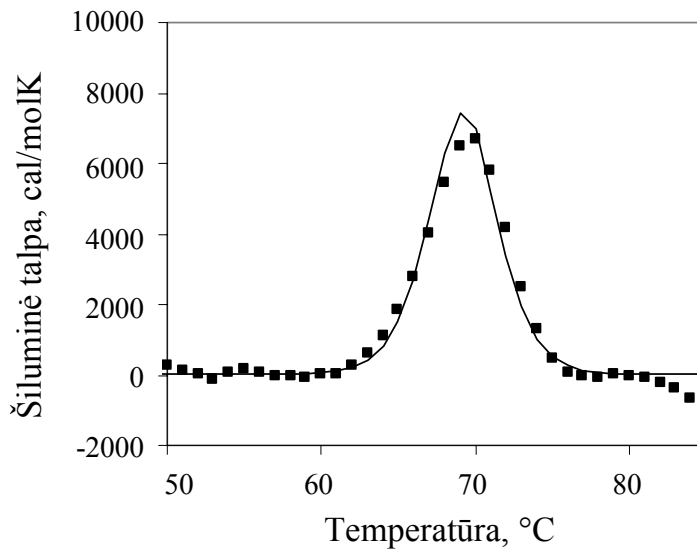
1.25 pav. parodyta lizocimo termograma. Pradiniai duomenys parodyti juoda kreive. Matome, kad potranzitinė pagrindinė linija turi didelį neigiamą nuokrypį. Tokiu atveju neįmanoma tiksliai nustatyti denatūracijos šiluminės talpos pokyčio. Iš duomenų nustatysime tik entalpijos pokytį ir denatūracijos temperatūrą. Taip pat matome, koks duomenų „triukšmas“ bei taškų išsibarstymas. Parenkame pagrindinę liniją programa Origin taip, kad ji apytiksliai sutaptų su iki- ir po-tranzitinėmis pagrindinė-

mis linijomis. Tada iš duomenų atimame pagrindinę liniją. Gauname mėlyną kreivę, kurios abi pagrindinės linijos lygios nuliui, o pikas žymi perteklinę šiluminę talpą denatūracijos metu.

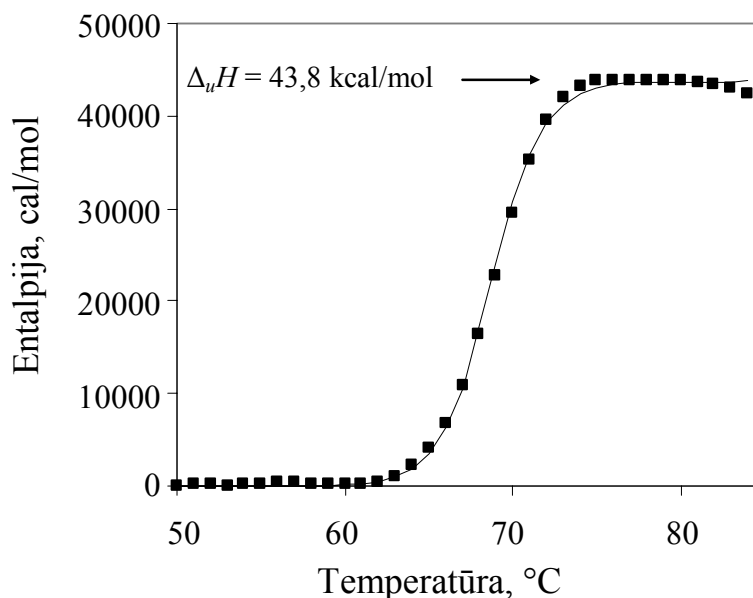
Suvidurkiname kiekvienos temperatūros pamatuotus taškus, gauname termogramą, parodytą 1.26 pav., čia taškai žymi eksperimentines reikšmes po pagrindinės linijos atėmimo, o linija – modelį. 1.27 pav. parodyta ta pati termograma integruotame pavidale. Ji gauta susumavus kiekvienos temperatūros šilumines talpas, parodytas 1.26 pav.



1.25 pav. Lizocimo (1 mg/ml) termograma, pagrindinės linijos apytikslis atėmimas



1.26 pav. Lizocimo (1 mg/ml) termogramos teorinės kreivės pritaikymas (regresija)



1.27 pav. Lizocimo denatūracijos termogramos integruotas vaizdas

Entalpija, pavaizduota 1.27 pav., gaunama integruojant šiluminę talpą, pavaizduotą 1.26 pav:

$$\int_{T_1}^{T_2} C_p dT = \Delta_u H . \quad (1)$$

Tuo tarpu diferencijuojant entalpiją, galima gauti šiluminę talpą:

$$\frac{dH}{dT} = \Delta_u C_p . \quad (2)$$

Šiluminė talpa yra fundamentalioji savybė, iš jos išvedami visi kiti termodinaminiai parametrai. Bet kokios medžiagos absoliučiosios entalpijos (H) ir entropijos (S) yra proporcingos bendrai šiluminės energijos absorbcijai, kai kaitiname nuo absoliučiojo nulio iki temperatūros T :

$$H = \int_0^T C_p dT + H_0 . \quad (3)$$

Čia H_0 yra žemiausio lygio energija (kai temperatūra lygi 0 K), susidariusi dėl cheminio ryšio ir kitų neterminių poveikių.

$$S = \int_0^T \left(\frac{C_p}{T} \right) dT . \quad (4)$$

Molekulinis entalpijos H interpretavimas gana paprastas. Tai yra bendra energija (įskaitant ir slėgio ar tūrio darbo dėmenis), sugerta keliant sistemos temperatūrą iki temperatūros T ir esant pastoviam slėgiui. Tai apima energiją, susijusią su visais atomų ir molekulių judėjimais – translacija, rotacija, vibracija, ir t.t. – kartu su energija, sukelta tarpmolekulinė jungčių pokyčių.

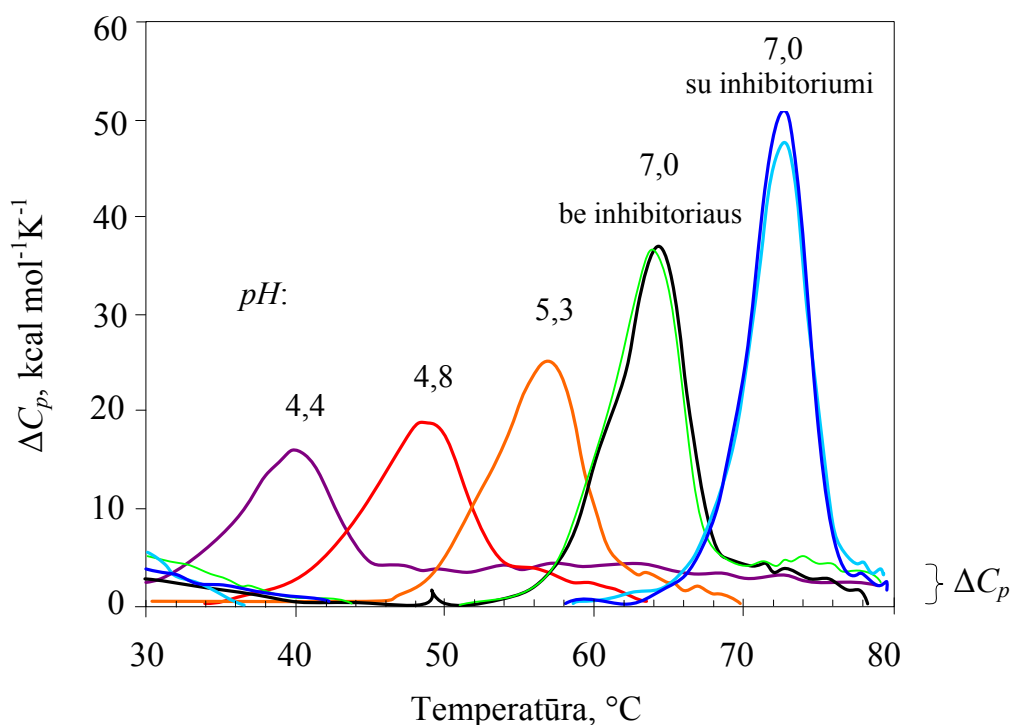
Entropiją sudėtingiau įsivaizduoti. Paprastai ji vaizduojama kaip molekulių betvarkės matas. Tačiau tai paslepia jos ryšį su šilumine talpa, kuris akivaizdus iš pateiktų lygčių. Galbūt lengviau įsivaiz-

duoti entropiją kaip galimybių skaičių, kuriomis molekulės sistemoje gali paaimti energiją, nepakeldamos temperatūros.

Šiluminės talpos dydis priklauso nuo galimybių skaičiaus, kuriomis į sistemą patekusi šiluminė energija gali būti paskirstyta. Įsivaizduokime energijos kiekį, kurio reikia, kad pakeltume sistemos temperatūrą vienu laipsniu. Jei sistema turi mažai galimybių paskirstyti pridėtą energiją, tada mažai energijos prireiks, kad pakeltume temperatūrą vienu laipsniu, ir tokia sistema turės gana mažą šiluminę talpą. Tačiau jeigu yra daugybė būdų, kuriais pridėta energija gali būti paskirstyta tarp molekulių (pvz., įvairios vibracijos, rotacijos galimybės arba suardytos jungtys), tada daug energijos prireiks tam pačiam temperatūros pakilimui. Tokia sistema jau turės gana didelę šiluminę talpą. Taip pat pridėdami šilumos į bet kokią sistemą, didiname jos entropiją, suteikdami molekulėms daugiau energijos tyrinėti daugiau įvairių išsidėstymo galimybių, tapti labiau netvarkingomis.

1.5.8. DSC taikymas ligandų jungimuisi ir stabilumui tam tikromis sąlygomis nustatyti

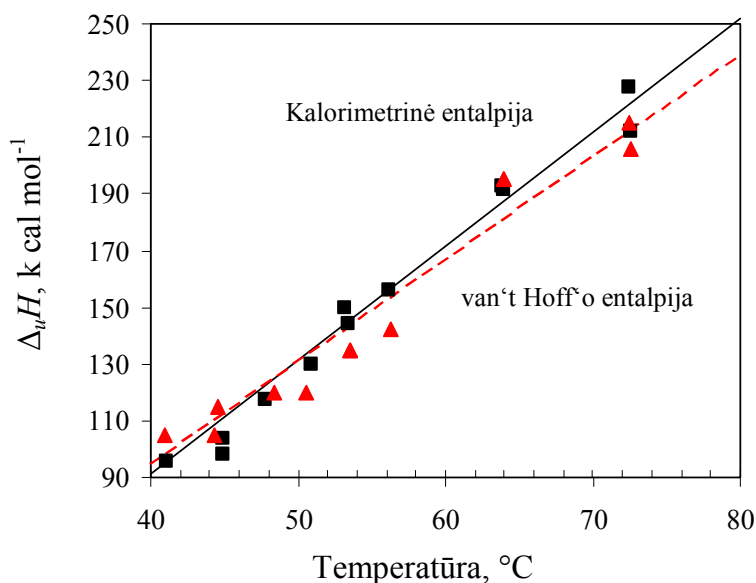
1.28 pav. parodytos DSC termogramos, gautos temperatūra denatūruojant karboanhidrazę įvairiomis sąlygomis – rūgštiniame pH ar pridėjus stabilizuojančio ligando.



1.28 pav. Jaučio karboanhidrazės II DSC termogramos įvairiomis sąlygomis [4]

Žeminant pH nuo 6 iki 4, karboanhidrazės stabilumas stipriai mažėja. Jei pH yra apie 7, ji denatūruoja apie 64 °C, kai pH – 4,4, tai denatūracijos smailė jau yra apie 40 °C. Jeigu įdedame stabilizuojančio ligando, pvz., acetazolamido, tada kai pH – 7, denatūracijos smailė pasislenka į aukštesnės temperatūros pusę. Šiame pav. nagrinėjame keletą svarbių DSC parametrų. Pirma, žemėjant denatūracijos temperatūrai, mažėja DSC piko plotas, t.y. mažėja denatūracijos entalpija. Denatūracijos entalpijos mažėjimas, žemėjant temperatūrai, arba denatūracijos entalpijos didėjimas, kylant temperatūrai, yra

nulemtas denatūracijos šiluminės talpos pokyčio, kuris 1.28 pav. yra ΔC_p . Potranzitinė pagrindinė linija yra aukščiau negu ikitranzitinė. Šiluminės talpos pokytį galime nustatyti iš integruotų termogramų – iš entalpijos priklausomybės nuo temperatūros. Teoriškai šios dvi šiluminės talpos pokyčio vertės turėtų sutapti.



1.29 pav. Kalorimetrinės ir van't Hoff'o entalpijos nustatymas iš DSC termogramos duomenų (tokių kaip 1.28 pav.)

Kalorimetrinės entalpijos gautos integruojant DSC termogramas, o van't Hoff'o entalpijos – regresuojant duomenis denatūravimo modeliu. Tiesės rodo linijines regresijas mažiausių kvadratų metodu, o jų pokrypio kampai lygūs kalorimetrinės ir van't Hoff'o šiluminės talpos pokyčiams

1.6. Baltymų ir ligandų jungimosi ir stabilizavimo termodinaminis modelis

Įsivaizduokime konjuguotas (sujungtas) reakcijas, kurių metu baltymas išsivynioja, taip pat jungiasi ligandas, kuris gali baltymą stabilizuoti jungdamasis prie jo natyvios būsenos. Jeigu ligandas stipriau jungtųsi prie denatūruotos būsenos, tada jis destabilizuotų baltymą, sumažintų jo išsivyniojimo temperatūrą. Čia mes nagrinėjame supaprastintą variantą, kai darome prielaidą, jog ligandas jungiasi tik prie natyvios baltymo būsenos ir ją stabilizuoja. Stabilizacijos dydis priklauso nuo daugelio parametrų, tarp jų ir nuo jungimosi stiprumo.



Čia U – išsivyniojęs baltymas, L_f – laisvas (neprisijungęs) ligandas, N – natyvus baltymas ir NL_b – natyvaus baltymo ir prisijungusio ligando komplekso koncentracija.

Baltymo stabilumo pusiausvyros konstanta lygi:

$$K_u = \frac{[N]}{[U]} = e^{\frac{\Delta_u G}{RT}} \quad (2)$$

Ligando jungimosi pusiausvyros konstanta lygi:

$$K_b = \frac{[NL_b]}{[N][L_f]} = e^{-\frac{\Delta_b G}{RT}}. \quad (3)$$

Baltymo ir ligando tvermės lygtys:

$$P_t = [N] + [U] + [NL_b]. \quad (4)$$

$$L_t = [L_f] + [NL_b]. \quad (5)$$

Matematinis – algebrinis modelio išvedimas:

$$K_u = \frac{[N]}{[U]}; \quad [N] = K_u [U]; \quad [U] = \frac{[N]}{K_u}$$

$$P_t = [U] + [N] + [NL_b] = [U] + K_u [U] + [NL_b] = [U](1 + K_u) + [NL_b]$$

$$[U] = \frac{P_t - [NL_b]}{(1 + K_u)}$$

$$f_u = \frac{[U]}{P_t} = \frac{[U]}{[U](1 + K_u) + [NL_b]} = \frac{\frac{P_t - [NL_b]}{(1 + K_u)}}{\frac{P_t - [NL_b]}{(1 + K_u)} + [NL_b]} = \frac{P_t - [NL_b]}{P_t(1 + K_u)}$$

$$\text{kai } T = T_m, \text{ tada } f_u = 0,5 = \frac{P_t - [NL_b]}{P_t(1 + K_u)}$$

$$[NL_b] = P_t - 0,5P_t - 0,5K_u P_t = 0,5P_t(1 - K_u)$$

$$P_t = [U] + [N] + [NL_b] = \frac{[N]}{K_u} + [N] + [NL_b] = \frac{(1 + K_u)}{K_u} [N] + [NL_b]$$

$$[N] = \frac{K_u}{(1 + K_u)} (P_t - [NL_b])$$

$$K_b = \frac{[NL_b]}{[N]L_f} = \frac{[NL_b]}{[N](L_t - [NL_b])}$$

$$[NL_b] = K_b [N](L_t - [NL_b]) = K_b \frac{K_u}{(1 + K_u)} (P_t - [NL_b])(L_t - [NL_b])$$

$$\frac{K_b K_u}{(1 + K_u)} \left([NL_b]^2 - [NL_b] \left(P_t + L_t + \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right) + P_t L_t \right) = 0$$

$$[NL_b] = \frac{1}{2} \left(- \left(-P_t - L_t - \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right) \pm \sqrt{\left(-P_t - L_t - \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right)^2 - 4P_t L_t} \right)$$

$$[NL_b] = 0,5P_t(1 - K_u)$$

$$\begin{aligned}
2 \times 0,5 P_t (1 - K_u) &= \left(P_t + L_t + \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right) \pm \sqrt{\left(P_t + L_t + \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right)^2 - 4 P_t L_t} \\
P_t - K_u P_t - \left(P_t + L_t + \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right) &= \pm \sqrt{\left(P_t + L_t + \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right)^2 - 4 P_t L_t} \\
\left(-K_u P_t - L_t - \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right)^2 &= \left(P_t + L_t + \frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right)^2 - 4 P_t L_t \\
K_u^2 P_t^2 + 2 K_u P_t L_t + 2 K_u P_t \frac{1 + K_u}{K_b K_u} + L_t^2 + 2 L_t \frac{1 + K_u}{K_b K_u} + \left(\frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right)^2 &= \\
= P_t^2 + 2 P_t L_t + 2 P_t \frac{1 + K_u}{K_b K_u} + L_t^2 + 2 L_t \frac{1 + K_u}{K_b K_u} + \left(\frac{1 + K_u}{K_b K_u} \right)^2 - 4 P_t L_t \\
K_u^2 P_t^2 + 2 K_u P_t L_t + 2 K_u P_t \frac{1 + K_u}{K_b K_u} &= P_t^2 + 2 P_t L_t + 2 P_t \frac{1 + K_u}{K_b K_u} - 4 P_t L_t \\
2 P_t L_t (K_u + 1) &= P_t \left(P_t (1 - K_u^2) + 2 \frac{1 + K_u}{K_b K_u} (1 - K_u) \right) \\
L_t = \frac{P_t}{2} (1 - K_u) + \frac{1 - K_u}{K_b K_u} &= (1 - K_u) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{K_b K_u} \right)
\end{aligned}$$

Gavome galutinę lygtį, kuri aprašo priklausomybę tarp jungimosi ir denatūracijos konstantų ir bendrų ligando ir baltymo koncentracijų:

$$L_t = (1 - K_u) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{K_b K_u} \right). \quad (6)$$

Silpnai susijungiančių ligandų formulę galime dar supaprastinti, jeigu patenkinta sąlyga, kad $P_t < (K_d = K_b^{-1})$, t.y. kai jungimosi konstantos eilė didesnė negu baltymo koncentracijos eilė.

$$L_t = (1 - K_u) \frac{1}{K_b K_u}. \quad (7)$$

Išreiškiame laisvąją Gibso energiją per entalpiją ir entropiją:

$$\Delta_u G = \Delta_u H - T \Delta_u S. \quad (8)$$

Čia entalpija ir entropija yra priklausomos nuo temperatūros. Jas išreiškiame per šiluminę talpą (prielaida – šiluminė talpa nepriklauso nuo T) ir entalpiją bei entropiją, esant lyginamajai temperatūrai T_r :

$$\Delta_u H = \Delta_u H_{T_r} + \Delta_u C_p (T - T_r). \quad (9)$$

$$\Delta_u S = \Delta_u S_{T_r} + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_r}. \quad (10)$$

Įstatę lygtis (9) ir (10) į (8), gauname išsivyniojimo (denatūracijos) proceso laisvąją Gibso energiją:

$$\Delta_u G = \Delta_u H_{T_r} + \Delta_u C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_u S_{T_r} + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_r} \right). \quad (11)$$

Ligandų jungimosi proceso energija:

$$\Delta_b G = \Delta_b H_{T_0} + \Delta_b C_p (T - T_0) - T \left(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \ln \frac{T}{T_0} \right). \quad (12)$$

Čia $T_0 = 37^\circ\text{C}$, arba kita pasirinkta temperatūra, kuriai nustatome ligando jungimosi konstantą. Įsistatome lygtį (11) į lygtį (2), o (12) į (3):

$$K_u = \frac{[N]}{[U]} = e^{\frac{\Delta_u G}{RT}} = e^{\frac{\Delta_u H_{T_r} + \Delta_u C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_u S_{T_r} + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_r} \right)}{RT}}. \quad (13)$$

$$K_b = \frac{[NL_b]}{[N][L_f]} = e^{\frac{\Delta_b G}{RT}} = e^{\frac{\Delta_b H_{T_0} + \Delta_b C_p (T - T_0) - T \left(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \ln \frac{T}{T_0} \right)}{RT}}. \quad (14)$$

Atkreipkime dėmesį, ar yra minuso ženklai eksponentėje (14), ar nėra (13). Taip pat atkreipkime dėmesį į temperatūras T_r ir T_0 . T_r yra baltymo denatūracijos temperatūra, kuri gali būti apie 60°C , o T_0 yra ligando jungimosi nagrinėjama temperatūra, kuri gali būti kūno ar kambario temperatūra. Dabar formules (13) ir (14) įsistatome į (6) formulę ir gauname gremėzdišką, tačiau svarbią lygtį, kuri susieja baltymo lydymosi temperatūrą T_r (arba T_m) su pridėta ligando koncentracija. Iš šios priklausomybės galime nustatyti ligando jungimosi konstantą.

$$L_t = \left(1 - e^{\frac{\Delta_u H_{T_r} + \Delta_u C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_u S_{T_r} + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_r} \right)}{RT}} \right) \times \left(\frac{\frac{P_t}{2} + \frac{1}{e^{\frac{\Delta_u H_{T_r} + \Delta_u C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_u S_{T_r} + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_r} \right)}{RT}}}}{e^{\frac{\Delta_b H_{T_0} + \Delta_b C_p (T - T_0) - T \left(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \ln \frac{T}{T_0} \right)}{RT}}} \right) \quad (15)$$

Panagrinėkime grafiškai, ką parodo ši lygtis, kokių priklausomybių galima tikėtis. Nagrinėjame ti-
pišką baltymą, kurio termodinaminiai stabilumo parametrai yra:

$$\Delta_u H_{T_r=60^\circ\text{C}} = 400 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}; \Delta_u C_p = 6000 \text{ J} \times \text{mol}^{-1}.$$

Denatūracijos entropiją apskaičiuojame esant temperatūrai T_r :

$$\Delta_u S_{T_r} = \frac{\Delta_u H_{T_r}}{T_r} = \frac{400 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}}{333 \text{ K}} = 1201 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}. \quad (16)$$

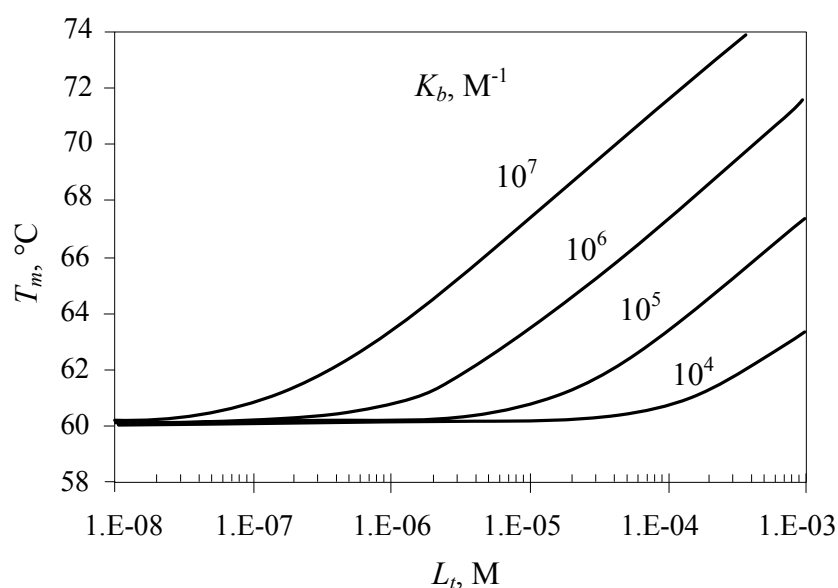
Nagrinėjamas baltymas prijungia vieną ligandą, jungimosi termodinaminiai parametrai yra:

$$\Delta_b H_{T_0=37^\circ C} = -20 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}; \Delta_b C_p = -800 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}.$$

Ligando jungimosi entropiją apskaičiuojame iš pasirinktos jungimosi konstantos per laisvąją Gibso energiją:

$$K_{b,T_0=37^\circ C} = 10^6 \text{ M}^{-1}; \Delta_b S_{T_0=37^\circ C} = \frac{\Delta_b H_{T_0=37^\circ C} - (-RT_0 \ln K_{b,T_0=37^\circ C})}{T_0}. \quad (17)$$

Taip pat nagrinėjamajame pavyzdyje baltymo hipotetinė koncentracija lygi nuliui ($P_t = 0$).

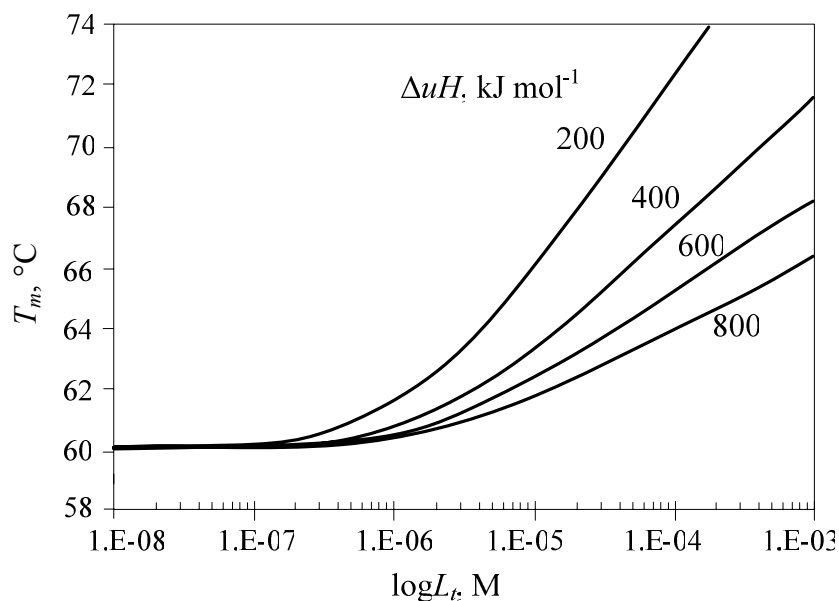


1.30 pav. Baltymo denatūracijos temperatūros simuliuotos priklausomybės nuo pridėtos ligando koncentracijos ir nuo ligando jungimosi konstantų

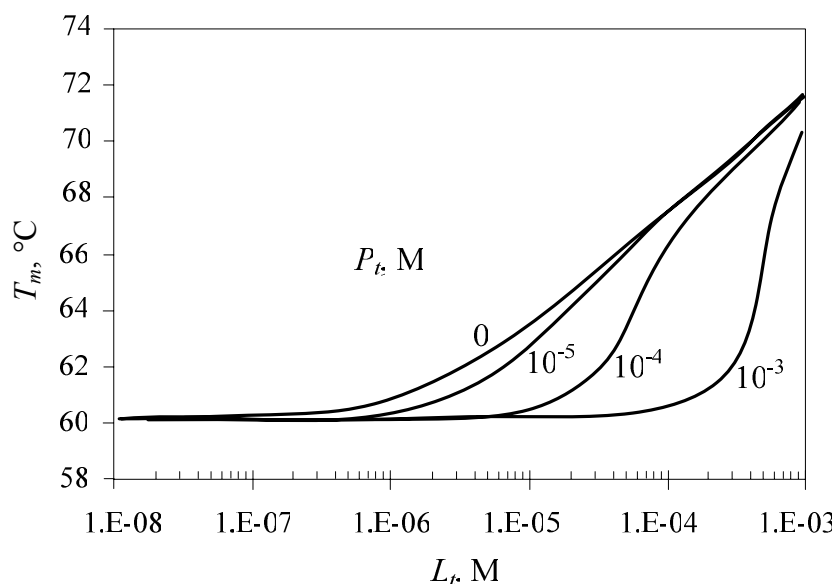
Juo stipriau ligandas jungiasi, juo labiau jis pakelia baltymo lydymosi temperatūrą, t.y. juo labiau stabilizuoja baltymą.

Lydymosi temperatūros pakėlimas labai priklauso nuo baltymo išsivyniojimo entalpijos. Juo ji didesnė, juo mažesnis temperatūros pakėlimas, kai visi kiti parametrai yra tokie patys (1.31 pav.).

Kai baltymo koncentracija didesnė už jungimosi konstantą, atsiranda priklausomybės sigmoidiškumas. Turi būti pridėta bent 1 molekulė ligando kiekvienai baltymo molekulei, kad lydymosi temperatūra pakiltų kaip numatyta.



1.31 pav. Baltymo lydymosi temperatūros priklausomybė nuo pridėtos ligando koncentracijos esant įvairioms denatūracijos entalpijoms, kai visi kiti parametrai lieka tokie patys



1.32 pav. Baltymo lydymosi temperatūros simuliuota priklausomybė nuo ligando koncentracijos esant įvairioms baltymo koncentracijoms, kai visi kiti parametrai tokie patys

Svarbu pabrėžti, kad pridėdamas vis daugiau ligando, baltymo lydymosi temperatūra T_m nuolatosis kyla, nors baltymas jau seniai prisotintas ligando, ir naujai pridėtam ligandui nebeįmanoma prisijungti prie baltymo. Šis reiškinys gerai parodo maišymo entropijos indėlį. Dažna klaida, kai manoma, jog jungtys tarp baltymo ir ligando kažkaip stabilizuoja ir sulaiko baltymą nuo denatūracijos. Jei pridėtume tiek ligando, kad jis prisotintų baltymo jungimosi vietas, tada lydymosi temperatūra daugiau nekiltų, pridėdamas vis daugiau ligando. Daugybė bandymų su baltymais rodo, kad taip nėra. Termodinaminis paaiškinimas – didesnis baltymo stabilumas susidaro, nes reikia papildomos laisvosios energijos, norint „nutraukti“ ligandus nuo baltymo prieš baltymo išsivyniojimą. Šios laisvosios energijos svarbi su-

dedamoji dalis yra disocijuoto ligando maišymo entropija. Stabilizavimas visai nepriklauso nuo baltymo konformacijos, bet priklauso nuo laisvojo ligando koncentracijos tirpale.

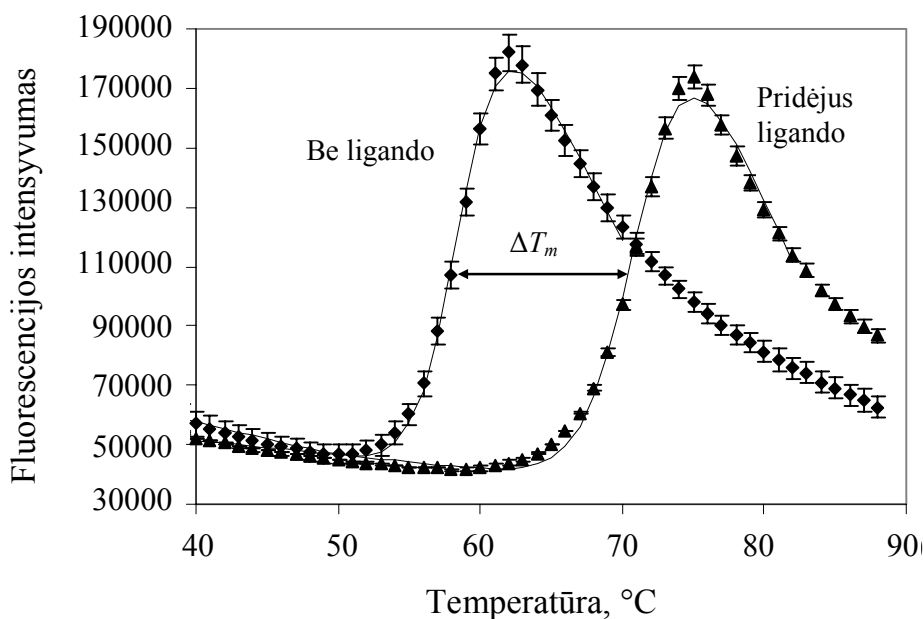
Šios formulės ir baltymo stabilizavimo ligandu reiškinys taikomas terminio poslinkio metode, kuris aprašytas kitame skyriuje.

1.7. Terminio poslinkio metodas

1.7.1. Terminio poslinkio metodo teorija ir taikymas ligandų jungimosi konstantoms nustatyti

Baltymo stabilumo matavimas dar neseniai buvo gana sudėtingas uždavinys. Tačiau sukūrus terminio poslinkio metodą, pradėjus naudoti plokšteles, kur galima vienu metu matuoti 96 arba net 384 baltymus ar mėginius, jis tapo vienu svarbiausių metodų ir matuojant ligandų jungimosi konstantas, ir norint nustatyti, kokiomis sąlygomis konkretų baltymą saugoti ar atlikti tam tikrą bandymą su juo.

Terminio poslinkio metodu netiesiogiai matuojame baltymo terminį stabilumą. Į tiriamąjį baltymo tirpalą reikia pridėti dažo – reporterio, kurio fluorescencija kinta, baltymui išsivyniojant. Dažniausiai toks dažas yra anilino-naftalino sulfonatas (ANS), kurio fluorescencija aprašyta fluorescencijos skyrelyje. Veikiamas temperatūros baltymas išsivynioja, tada atsiveria naujos hidrofobinės baltymo vietos, kuriose ANS gali prisijungti ir fluorescuoti daug stipriau negu vandeniniame tirpale.



1.33 pav. Baltymo stabilumo nustatymas fluorescentiniu terminio poslinkio metodu

1.33 pav. parodytos tipiškos baltymo denatūracijos kreivės. Taškai žymi jaučio karboanhidrazės II eksperimentines fluorescencijos reikšmes, gautas Thermofluor® aparatu. Paklaidos gautos iš 4 kartojimų identiškomis sąlygomis. Linija žymi aproksimaciją dviejų stadijų modeliu, aprašytu žemiau. Temperatūra keliama nuolatiniu, apie 1 °C per minutę greičiu. Iš pradžių stebima fluorescencija tolygiai palengva mažėja, nes mažėja ANS fluorescencija keliant temperatūrą. Tada fluorescencija pastebimai padidėja, pasiekia maksimumą ir ima vėl tolygiai mažėti. Fluorescencijos didėjimo metu baltymai

mas denatūruoja, išsivynioja, atsiveria papildomos vietos ANS prisijungti, čia ANS yra nepasiekiamas vandeniui, kuris gesina fluorescenciją.

Tokius duomenis galima gana tiksliai aproksimuoti dviejų stadijų baltymų denatūracijos modeliu, kuris aprašytas baltymų denatūracijos modelio skyriuje.

Fluorescencijos priklausomybę nuo temperatūros galime aproksimuoti tokia lygtimi:

$$y = y_N + \frac{y_U - y_N}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}} = y_U + \frac{y_N - y_U}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}}, \quad (1)$$

Čia y_N ir y_U yra atitinkamai natyvaus ir denatūravusio baltymo fluorescencija. Tiksliau tai yra ne baltymo, bet dažo-baltymo komplekso fluorescencija. Abi šios fluorescencijos priklauso nuo temperatūros, t.y. ikitranzitinė ir potranzitinė pagrindinės linijos nėra horizontalios. Jas mes aproksimuojame tiesėmis:

$$y_N = y_{N,T_m} + m_N (T - T_m). \quad (2)$$

$$y_U = y_{U,T_m} + m_U (T - T_m). \quad (3)$$

Čia m_N ir m_U yra atitinkamai natyvaus ir denatūravusio baltymo fluorescencijos tiesių (pagrindinių linijų) nuokrypio kampai. Jeigu abi priklausomybės yra tokios, kad fluorescencija mažėja nuo temperatūros (kaip parodyta 1.33 pav.), tai abu m koeficientai yra neigiami. y_{N,T_m} ir y_{U,T_m} yra fluorescencijos reikšmės, esant denatūracijos temperatūrai T_m . Įstatę lygtis (2) ir (3) į (1) gauname:

$$y = y_{N,T_m} + m_N (T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}}. \quad (4)$$

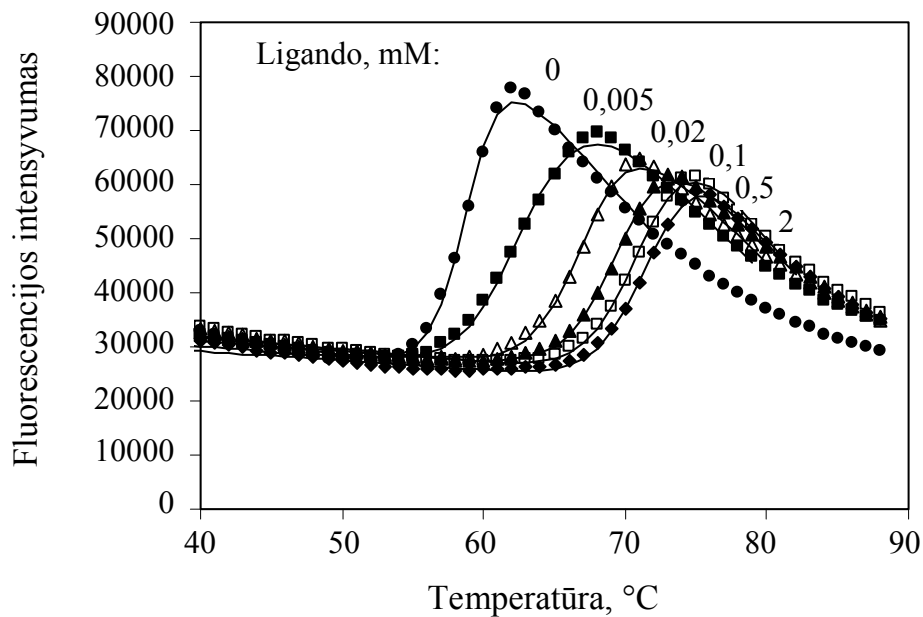
Pakeitę denatūracijos laisvosios Gibso energijos išraišką, gauname:

$$y = y_{N,T_m} + m_N (T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{\Delta_u H_{T_m} + \Delta_u C_p (T - T_m) - T \left(\Delta_u S_{T_m} + \Delta_u C_p \left(\ln \frac{T}{T_m} \right) \right)}{RT}}}. \quad (5)$$

Šioje lygtyje yra 6 parametrai (y_{N,T_m} , m_N , y_{U,T_m} , m_U , $\Delta_u H_{T_m}$, ir T_m), kuriuos mažiausių kvadratų metodu regresuojame prie eksperimentinių duomenų. Išsivyniojimo entropija yra pakeičiama entalpija, kai $T = T_m$:

$$\Delta_u S_{T_m} = \frac{\Delta_u H_{T_m}}{T_m}. \quad (6)$$

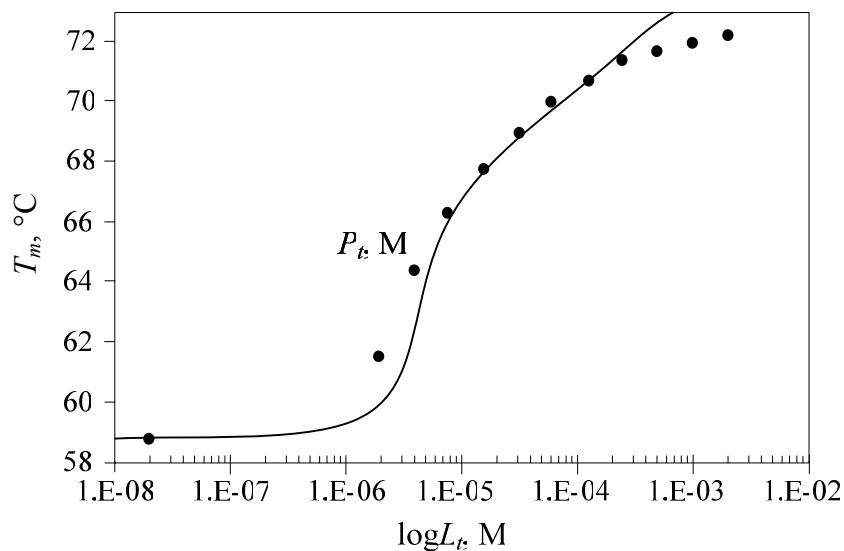
1.34 pav. parodytos denatūracijos kreivės, gautos pridėjus įvairias specifiskai susijungiančio ligando (trifluorometansulfonamido prie karboanhidrazės I) koncentracijas. Matome, kaip didesnės susijungiančio ligando koncentracijos pastumia baltymo lydymosi temperatūrą aukšty.



1.34 pav. Žmogaus karboanhidrazės I terminio denatūravimo fluorescentinės kreivės pridėjus įvairias ligando (trifluorometansulfonamido) koncentracijas

Reakcijos mišinyje buvo: 8,3 μ M hCAI, 25 mM MES buferio, pH – 6,1, 50 mM NaCl, 50 μ M ANS ir 2 proc. DMSO.

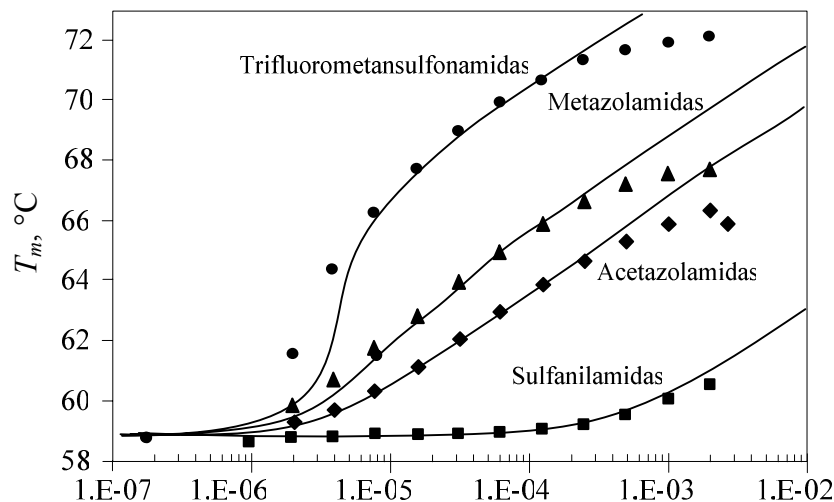
Atidėję T_m priklausomybę nuo pridėto ligando koncentracijos, gauname grafiką, parodytą 1.35 pav.



1.35 pav. Baltymo lydymosi temperatūros T_m priklausomybė nuo ligando koncentracijos L_t

Taškai žymi eksperimentines T_m reikšmes, o linija – modelį, apskaičiuotą remiantis formule (15). Pirmasis taškas, pažymėtas ties 2×10^{-8} , yra kontrolinis, čia nėra ligando. Matome, jog kreivė gana tiksliai pakartoja taškus, tačiau yra pora vietų, kur modelis ne visai atitinka eksperimentinius duomenis.

1.36 pav. parodytos kelių ligandų, turinčių skirtingas jungimosi konstantas, dozavimo kreivės.

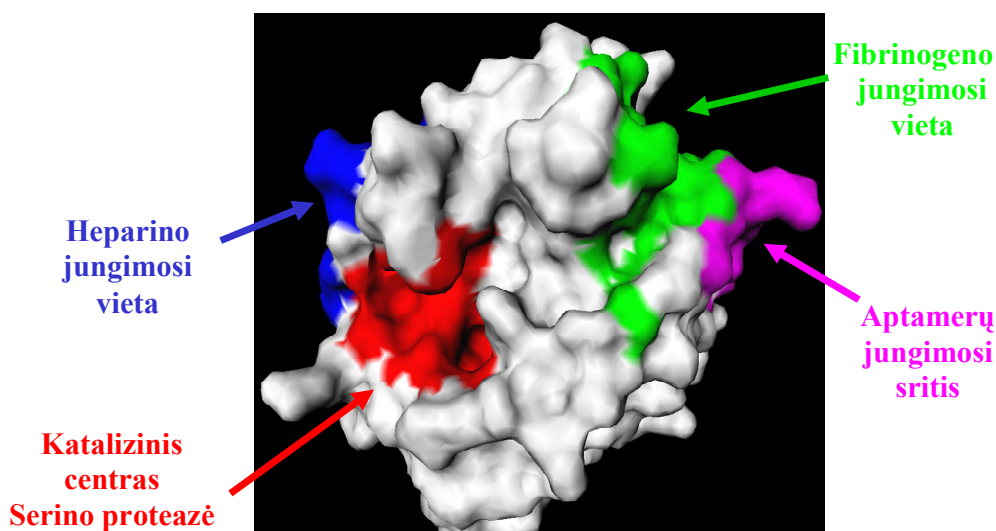


1.36 pav. Keleto ligandų dozavimo kreivės

Stipriai susijungiantis trifluorometansulfonamidas pakelia baltymo lydymosi temperatūrą gerokai stipriau negu vidutiniai ligandai – acetazolamidas ir metazolamidas, ir daug labiau negu silpnai susijungiantis sulfanilamidas.

Terminio poslinkio metodas yra labai universalus biofizikinis metodas, kurio rezultatai nepriklauso nuo konkrečios baltyminės sistemos. Todėl jį galima taikyti nežinomiems baltymams, kai nėra jokių žinomų fermentinio aktyvumo metodų ar kitų būdų jungtis su ligandais. Pavyzdžiui, trombinas turi keletą ligandų, kurie atlieka svarbias reguliacines funkcijas (1.37 pav.).

Trombino-ligandų jungimosi vietos



1.37 pav. Trombino ligandai, jų jungimosi prie trombino molekulės vietos (M. J. Todd)

Atliekant didelio pralaidumo atranką (*high-throughput screening*), kai ieškomi ligandai, galintys jungtis prie tiriamojo baltymo, galima atrasti visai netikėtų ligandų. Vėliau dozuojant ligandus, galima tuo pačiu metodu nustatyti kiekvieno jų jungimosi konstantą.

1.7.2. Terminio poslinkio metodo taikymas apibūdinant rekombinantinių baltymų stabilumą

Kai turime nežinomą baltymą, patogų jo tam tikras stabilumo savybes apibūdinti terminio poslinkio metodu, atliekant standartizuotą ir greitą testą, kuriam tereikia kelių mikrogramų baltymo. Vienas svarbiausių uždavinių pagaminus naują baltymą, yra nustatyti, ar jis tirpale stabilus, kokio *pH* reikia jį laikyti, kokių stabilizatorių reikėtų pridėti, kad baltymas išliktų stabilus norimą laiko tarpą.

Į tiriamojo baltymo tirpalą, kai baltymo koncentracija – apie 0,2-0,4 mg/ml, maža druskų ir buferio koncentracija, pridedame fluorescuojančio dažo (pvz. ANS, dapoksilo sulfonato) ir išpilstome gautą tirpalą į 96 šulinėlius po maždaug 2–10 µl. Tada į tuos pačius šulinėlius įpilame po 2–10 µl iš anksto paruoštų 96 reagentų tirpalų, kurių įtaką tiriamajam baltymui norime nustatyti. Ant viršaus pilame po 1–3 µl silikoninės alyvos, kad tirpalas kaitinant neišgaruotų. Tada galima šulinėlius užklijuoti, jei naudojame PCR plokšteles.

Tirpalus patogų dozuoti elektroniniais dozatoriais. Norint kad tirpalai gerai susimaišytų ir būtų šulinėlių dugnuose, o alyva pasiskirstytų viršuje, verta plokšteles trumpai centrifuguoti. Tokią plokštelę galima naudoti tikro laiko PGR (*Real-Time PCR*) aparatuose, arba ThermoFluor aparatuose, kurie kaitina plokštelę maždaug 1 °C per minutę greičiu ir nuolat matuoja fluorescenciją visuose šulinėliuose. Gauname 96 fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikus, kuriuos patogų apdoroti kompiuterinėmis programomis. Mes naudojame TFAlyst, tačiau ji nėra labai paplitusi.

1.6 lentelėje parodytas pavyzdys, kokių reagentų gali būti 96 šulinėlių plokštelėje.

1.6 lentelė. Reagentų tipiškas išdėstymas 96 šulinėlių plokštelėje

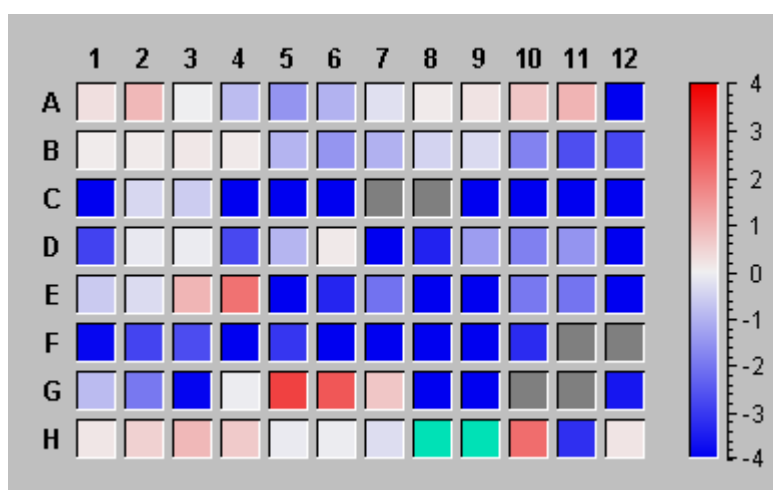
	1	2	3	4
A	5 mM NaCl	15 mM NaCl	50 mM NaCl	150 mM NaCl
B	5 mM MgCl ₂	5 mM CaCl ₂	5 mM SrCl ₂	5 mM BaCl ₂
C	50 µM Fe ₂ (SO ₄) ₃	50 µM CoCl ₂	50 µM NiCl ₂	50 µM CuCl ₂
D	10 µM Fe ₂ (SO ₄) ₃	10 µM CoCl ₂	10 µM NiCl ₂	10 µM CuCl ₂
E	100 mM NaF	100 mM NaCl	100 mM NaBr	100 mM NaI
F	50 µM EuCl ₃	50 µM CeCl ₃	50 µM TbCl ₃	50 µM RuCl ₃
G	2 proc. DMSO	5 proc. DMSO	10 proc. DMSO	vanduo
H	2 proc. Glicerolio	5 proc. Glicerolio	10 proc. Glicerolio	100 mM gliukozės

5	6	7	8
500 mM NaCl	1 M NaCl	100 mM Tris 7,0	100 mM Tris 7,5
100 mM KCl	100 mM LiCl	100 mM Hepes 6,5	100 mM Hepes 7,5
50 µM ZnCl ₂	50 mM NH ₄ Cl	100 mM Na citrato 3,5	100 mM Na citrato 4,5
10 µM ZnCl ₂	100 mM NaSCN	100 mM Mes 5,0	100 mM Mes 6,0
100 mM Na ₂ SO ₄	100 mM NaNO ₃	100 mM imidazolo 7,0	200 mM imidazolo 7,0
50 µM YCl ₃	5 mM EDTA	100 mM NaAc 4,0	100 mM NaAc 4,5
250 mM urėjos	500 mM urėjos	1000 mM urėjos	250 mM GuaCl
0,05 mM dapoksilo sulfonato, 0,5 proc. DMSO	0.1 mM dapoksilo sulfonato, 0,5 proc. DMSO	0.15 mM dapoksilo sulfonato, 0,5 proc. DMSO	vanduo

9	10	11	12
100 mM Tris 8,0	100 mM Tris 8,5	100 mM Tris 9,0	100 mM Gly 9,5
100 mM Hepes 8,5	100 mM NaP _i 6,0	100 mM NaP _i 7,0	100 mM NaP _i 8,0
100 mM Na citrato 5,5	100 mM Na citrato 6,5	100 mM Na citrato 7,5	100 mM NaHCO ₃ 8,0
100 mM Mes 7,0	100 mM Pipes 6,5	100 mM Pipes 7,5	100 mM Na ₂ CO ₃ 10,0
300 mM imidazolo 7,0	100 mM Na sukcinato 6,5	100 mM Na sukcinato	100 mM Naformato 4,0
100 mM NaAc 5,0	100 mM NaAc 5,5	100 mM Na formato 3,0	100 mM Na formato 3,5
500 mM GuaCl	1000 mM GuaCl	2000 mM GuaCl	2000 mM urėjos
vanduo	50 uM KMnO ₄	5 mM Cys	5 mM DTT

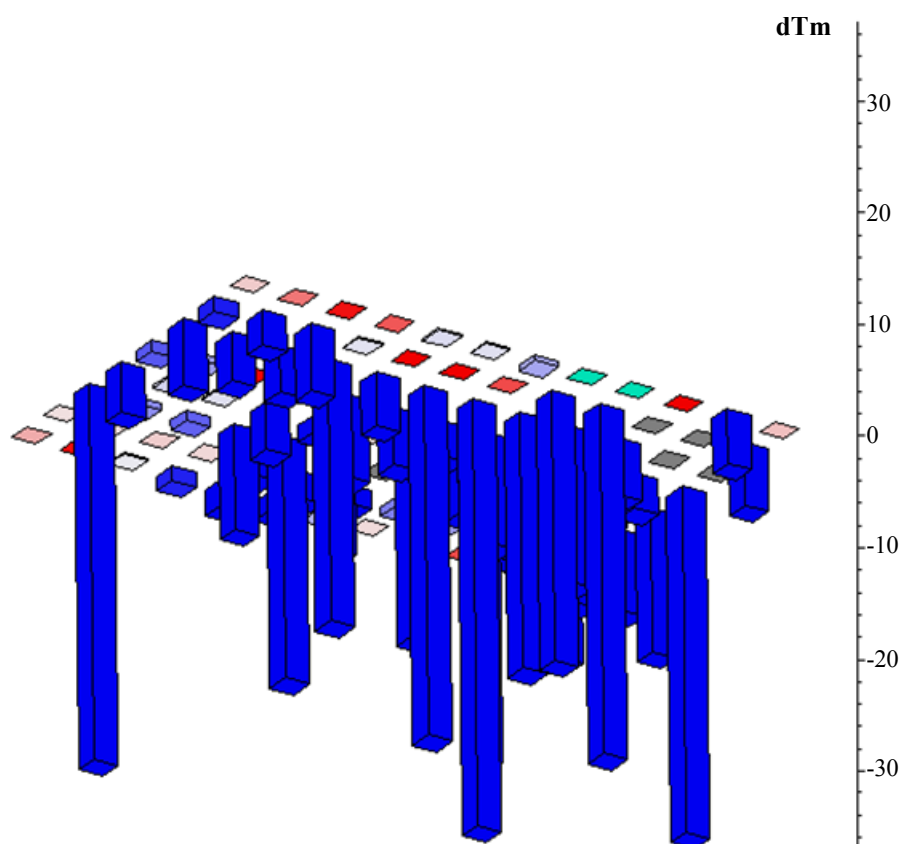
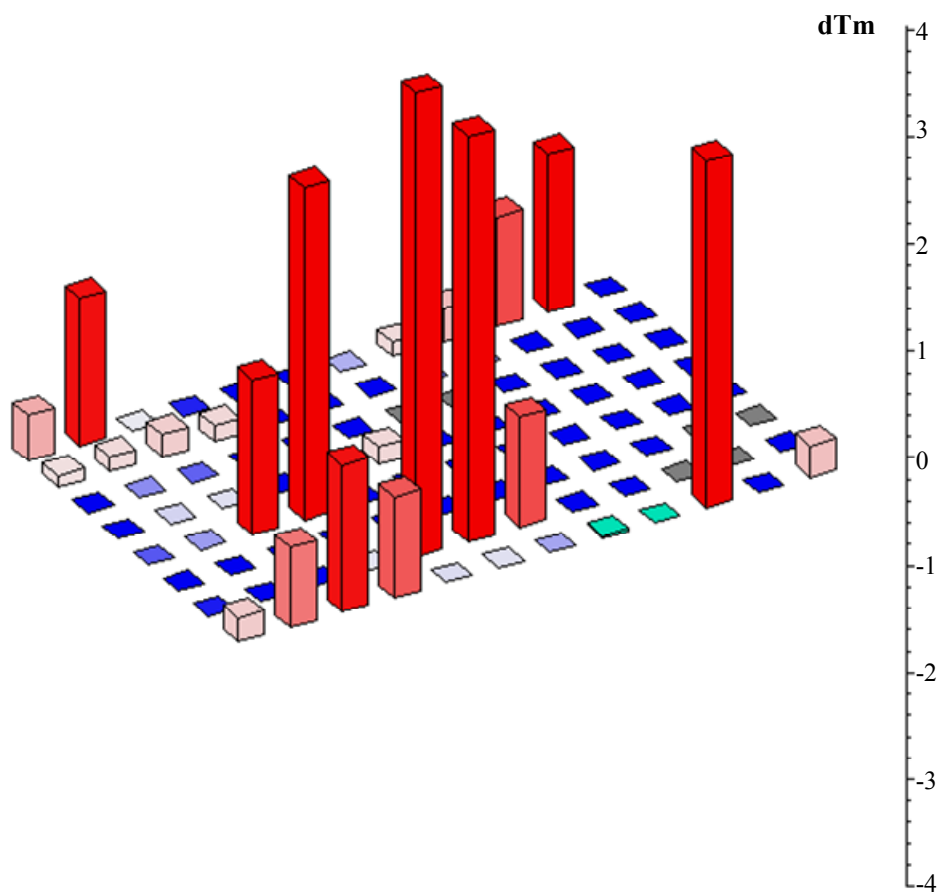
Vieni reagentai, pvz., įprastinės druskos ir buferiai, yra nepakeičiami baltymų tirpalų komponentai, todėl svarbu nustatyti jų įtaką baltymo stabilumui. Kiti reagentai, pvz., retieji metalai, yra labiau egzotiški, ir kartais gaunami netikėti stabilizavimo rezultatai. Tokioje plokštelėje galima išdėstyti ir daug kitų reagentų planuojant ir baltymo stabilumo nuo *pH* priklausomybių nustatymą, ir atsparumą dažnai naudojamiems organiniams tirpikliams, oksidatoriams, reduktoriams ir t.t.

1.38 pav. parodytas bendras plokštelės vaizdas, čia raudona spalva pažymėti šulinėliai, kur baltymo temperatūra pakilo, mėlyna – nukrito, o žalia pažymėti kontroliniai šulinėliai, kuriuos pasirenkame palyginti. Dažnai juose būna įpilta tik vandens. 1.39 pav. tas pats eksperimentas pavaizduotas kaip stulpeliai. Ar jie teigiami, ar neigiami, priklauso nuo stabilizavimo-destabilizavimo.



1.38 pav. Karboanhidrazę I apibūdinanti plokštelė

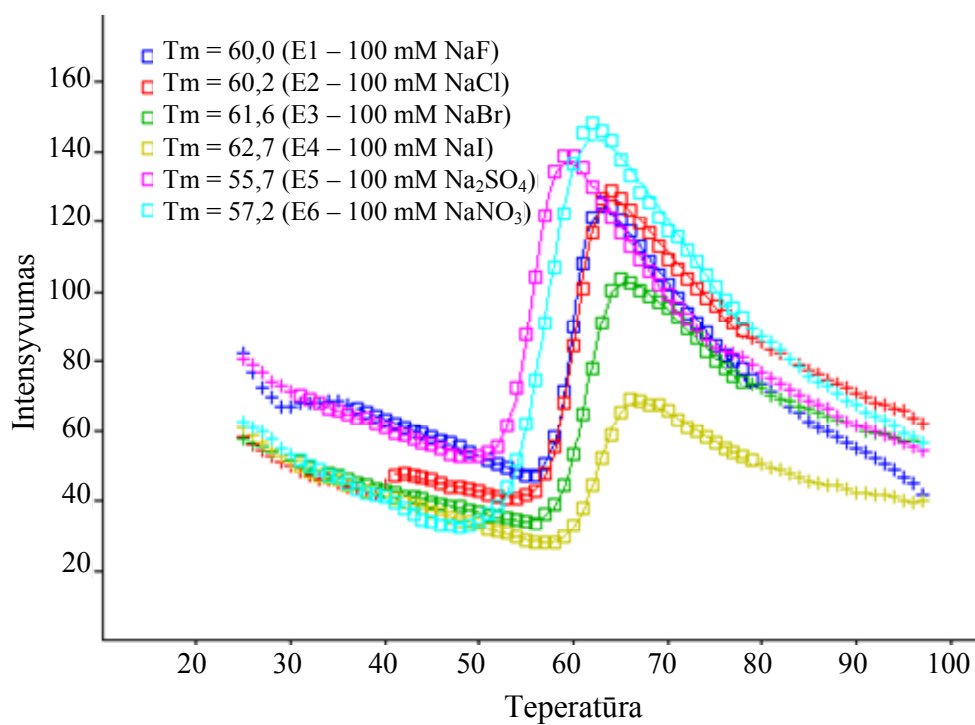
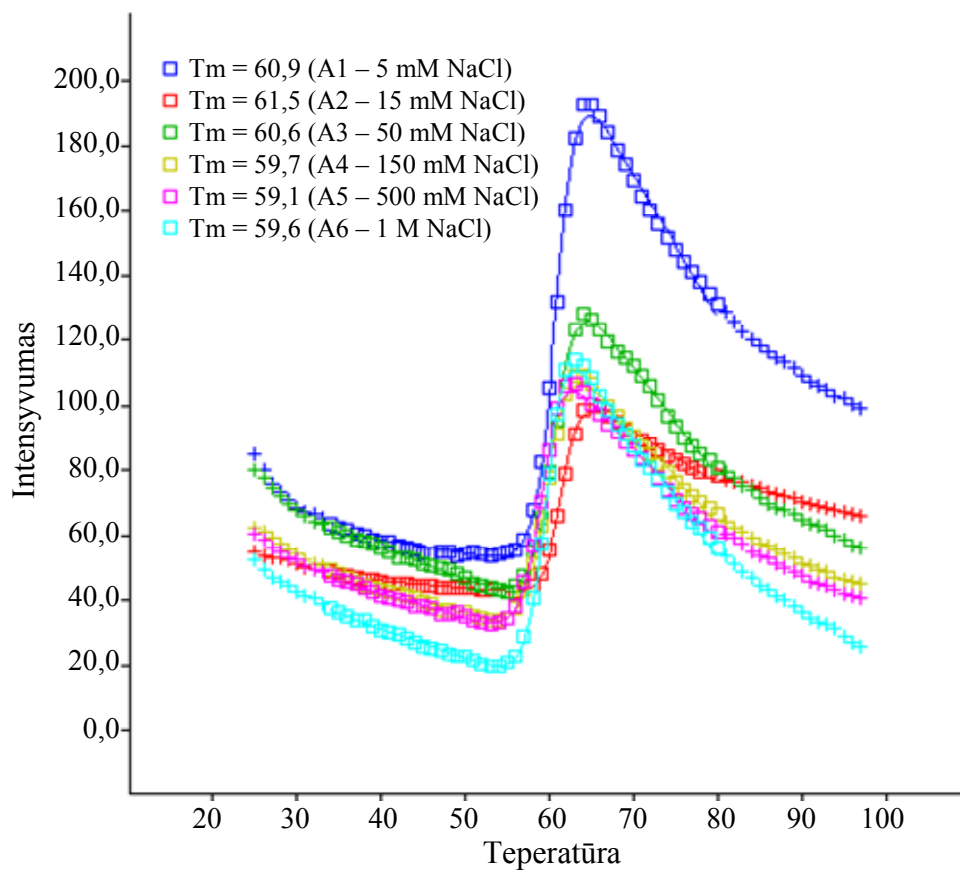
Raudona spalva pažymėti šulinėliai, kuriuose baltymas buvo stabilesnis negu žaliai pažymėtuose kontroliniuose, o mėlyna spalva – rodo mažesnį stabilumą. Pilka spalva pažymėti šulinėliai, kuriuose tranzicijų nematyti.

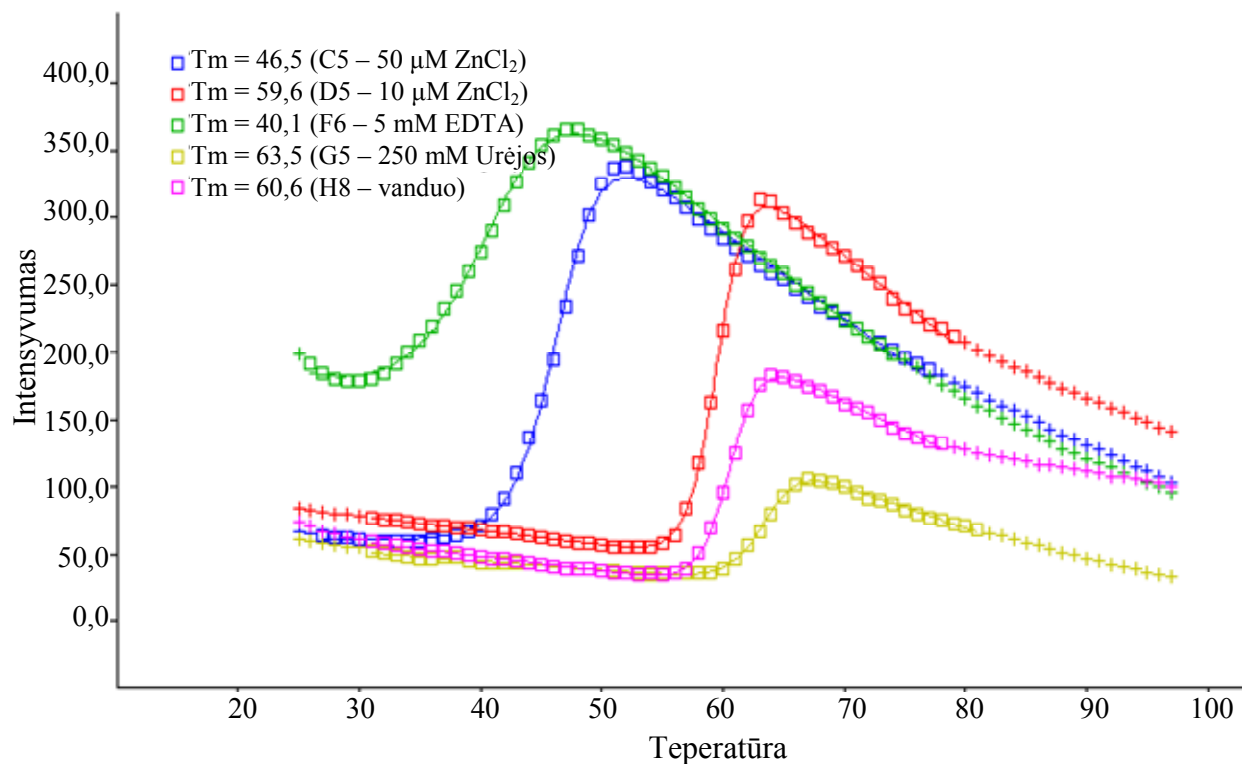


1.39 pav. Karboanhidrazę apibūdinantys rezultatai, pavaizduoti kaip stulpeliai. Pirmoje dalyje parodyti stabilizatoriai, antroje – destabilizatoriai

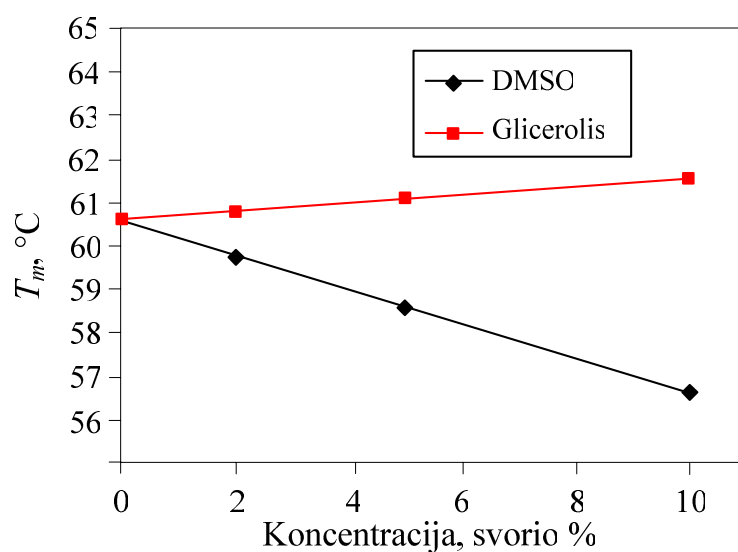
	id	n	chi2	yf	yfs	yu	yus	dH	dCp	Tm	To	dTm
A1	5 mM NaCl	47	162.1	50	-0.4	212	-4.4	182855	2500	60.868	60.584	0.2840
A2	15 mM NaCl	47	41.1	41	-0.2	106	-1.6	214174	2500	61.518	60.584	0.9344
A3	50 mM NaCl	47	52.9	36	-1.0	143	-3.3	166369	2500	60.557	60.584	-0.0262
A4	150 mM NaCl	47	68.7	28	-0.8	121	-2.9	169082	2500	59.724	60.584	-0.8600
A5	500 mM NaCl	47	57.7	28	-0.7	118	-2.8	183622	2500	59.058	60.584	-1.5260
A6	1 M NaCl	47	96.0	14	-0.9	127	-3.6	195725	2500	59.553	60.584	-1.0307
A7	100 mM Tris 7.0	47	20.7	19	-0.6	109	-2.6	178625	2500	60.320	60.584	-0.2640
A8	100 mM Tris 7.5	49	17.7	28	-0.5	88	-1.8	178998	2500	60.674	60.584	0.0906
A9	100 mM Tris 8.0	49	11.2	27	-0.4	75	-1.5	173894	2500	60.798	60.584	0.2143
A10	100 mM Tris 8.5	45	6.0	29	-0.5	69	-1.6	151554	2500	61.279	60.584	0.6950
A11	100 mM Tris 9.0	49	10.1	25	-0.6	57	-1.2	153849	2500	61.579	60.584	0.9950
A12	100 mM Gly 9.5	44	90.4	31	-0.9	117	-3.4	107379	2500	55.650	60.584	-4.9341
B1	5 mM MgCl2	50	170.0	40	-0.8	209	-4.9	189528	2500	60.652	60.584	0.0686
B2	5 mM CaCl2	50	100.1	42	-0.8	177	-3.9	195854	2500	60.676	60.584	0.0925
B3	5 mM SrCl2	51	92.3	46	-0.6	174	-3.5	193559	2500	60.726	60.584	0.1426
B4	5 mM BaCl2	50	76.2	42	-0.7	185	-4.3	188737	2500	60.687	60.584	0.1034
B5	100 mM KCl	47	147.7	23	-0.7	110	-2.6	126868	2500	59.588	60.584	-0.9953
B6	100 mM LiCl	50	113.5	37	-0.5	141	-2.8	157291	2500	59.074	60.584	-1.5101
B7	100 mM Hepes 6.5	49	65.3	31	-0.9	192	-4.8	197462	2500	59.535	60.584	-1.0484
B8	100 mM Hepes 7.5	49	16.4	29	-0.6	73	-1.8	186907	2500	60.111	60.584	-0.4722
B9	100 mM Hepes 8.5	51	19.8	23	-0.7	61	-1.3	145307	2500	60.222	60.584	-0.3621
B10	100 mM NaPi 6.0	39	28.7	42	-0.6	136	-3.5	156330	2500	58.745	60.584	-1.8388
B11	100 mM NaPi 7.0	39	22.6	30	-0.8	93	-2.3	172990	2500	57.880	60.584	-2.7035
B12	100 mM NaPi 8.0	39	10.8	20	-1.0	78	-2.3	148868	2500	57.750	60.584	-2.8336
C1	50 uM Fe2(SO4)3	35	160.8	279	-5.6	494	-9.7	67840	2500	38.572	60.584	-22.011
C2	50 uM CoCl2	50	259.0	39	-0.8	228	-3.7	181750	2500	60.169	60.584	-0.4146
C3	50 uM NiCl2	47	101.1	45	-0.9	308	-5.9	185605	2500	59.992	60.584	-0.5920
C4	50 uM CuCl2	41	77.1	28	-0.4	95	-1.7	141615	2500	54.387	60.584	-6.1964
C5	50 uM ZnCl2	51	752.6	60	0.0	376	-6.4	112253	2500	46.459	60.584	-14.124
C6	50 mM NH4Cl	48	252.6	39	-0.3	263	-5.5	119848	2500	54.809	60.584	-5.7746
C7	100 mM NaCitrate 3.5											
C8	100 mM NaCitrate 4.5											
C9	100 mM NaCitrate 5.5	45	298.1	41	-0.4	211	-4.8	120085	2500	44.968	60.584	-15.615
C10	100 mM NaCitrate 6.5	41	80.3	32	-1.4	138	-3.7	132584	2500	52.107	60.584	-8.4771
C11	100 mM NaCitrate 7.5	47	68.6	32	-1.2	117	-3.0	127528	2500	55.555	60.584	-5.0287
C12	100 mM NaHCO3 8.0	48	12.3	18	-0.7	45	-1.2	130413	2500	55.895	60.584	-4.6887

1.40 pav. Gautų apibūdinimo duomenų fragmentas – tokią informaciją gauname apie visas 96 de-natūravimo tranzicijas



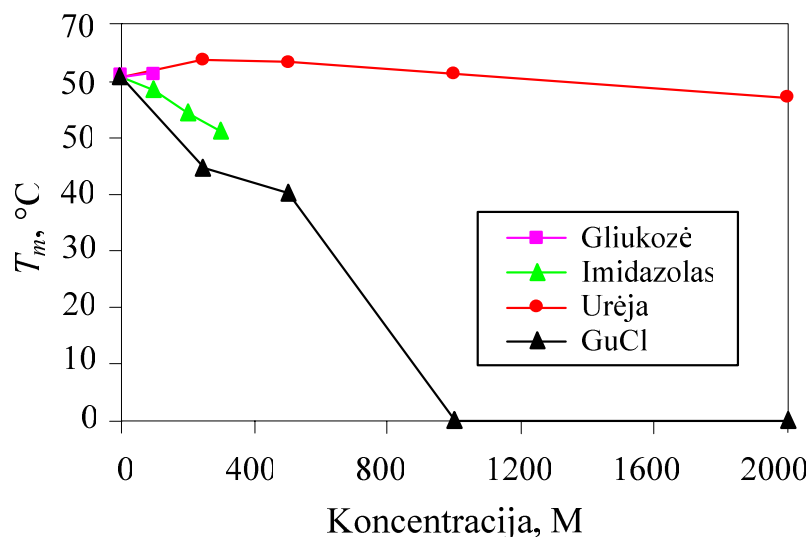


1.41 pav. Tos pačios apibūdinamosios plokštelės terminio denatūravimo kreivių rinkiniai. Jie parodo, kaip denatūracijos tranzicijos pakito pridėjus legendose pažymėtų reagentų



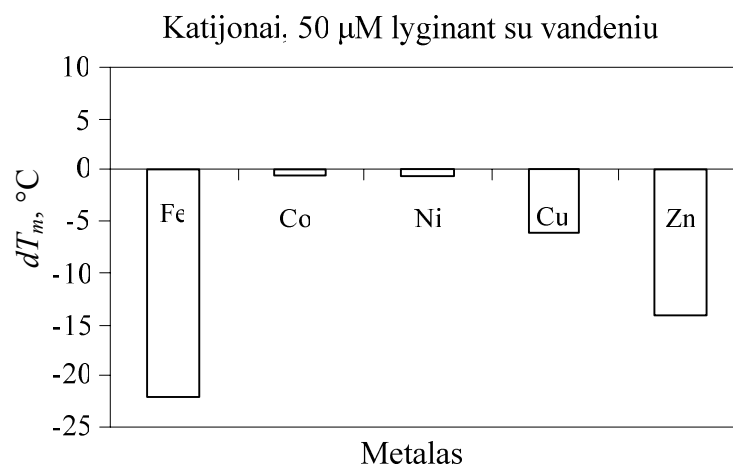
1.42 pav. Karboanhidrazės stabilumo (T_m) priklausomybė nuo organinių tirpiklių – dimetilsulfoksido ar glicerolio

Glicerolio dažnai dedama kaip baltymų stabilizatoriaus. Šiuo atveju jo pridėjimas šiek tiek pasiteisintų, jei norima stabilizuoti baltymą. Tuo tarpu dimetilsulfoksidas (DMSO) yra tam tikras karboanhidrazės destabilizatorius. Tą reikia prisiminti, kai atliekami ligandų jungimosi bandymai ir ligandai ištirpinti DMSO.



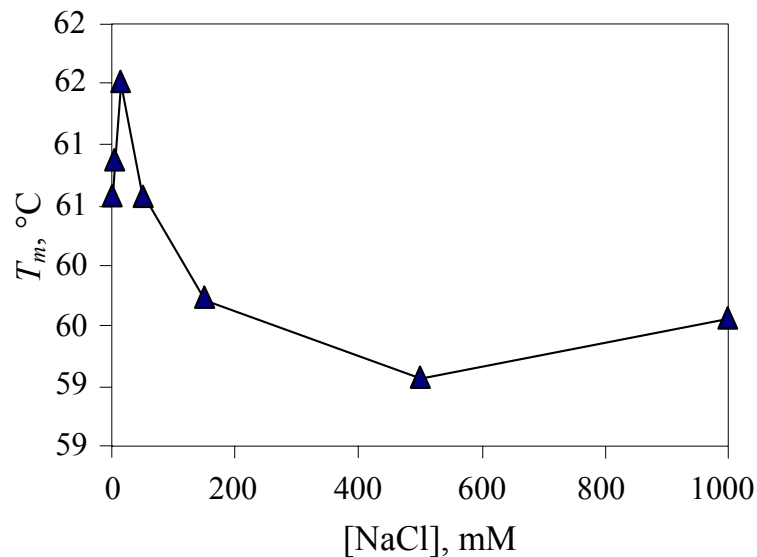
1.43 pav. Karboanhidrazės stabilumo priklausomybė nuo pridėtų osmolitų

Urėja paprastai laikoma baltymo destabilizatoriumi. Šiuo atveju ji gana ryškiai stabilizuoja karboanhidrazę iki apie 500 mM koncentracijos. Guanidino chloridas (GuCl) yra ryškus baltymo destabilizatorius. Toks rezultatas parodo, kad tranzicijas sukelia baltymo denatūracija, o ne kiti procesai. Imidazolo dedama išplaunant baltymus iš nikelio kolonėlių, jeigu jas gryninti naudojame histidino uodegas turintiems baltymams. Matome, kad imidazolas gana ryškiai destabilizuoja karboanhidrazę, tačiau ne per daug, kad galėtume atlikti gryninimo bandymus.



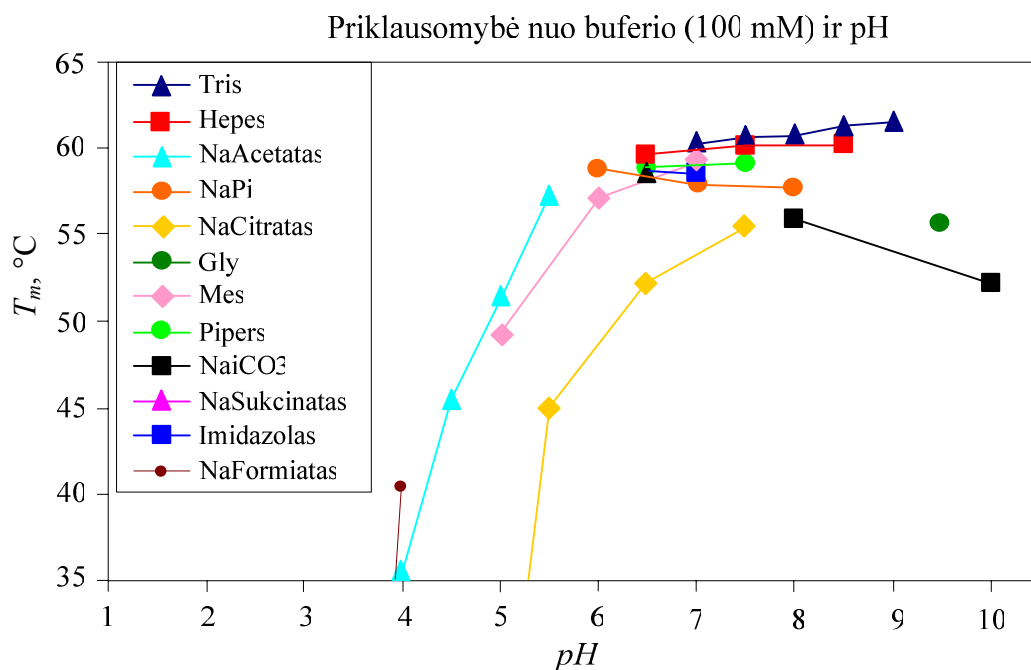
1.44 pav. Tam tikri metalai, labai ryškiai destabilizuojantys karboanhidrazę

Labai destabilizuoja trivalentė geležis, šiek tiek mažiau – cinkas. Tai gana netikėta, nes cinkas yra karboanhidrazės aktyviajame centre.



1.45 pav. Karboanhidrazės stabilumas įvairiose NaCl koncentracijose

Matome, kad valgomoji druska neturi aiškos įtakos karboanhidrazės stabilumui. Tam tikrose koncentracijose ji šiek tiek stabilizuoja ir destabilizuoja karboanhidrazę.



1.46 pav. Karboanhidrazės I stabilumo priklausomybė nuo pH ir buferio

Kaip ir būdinga baltymams, jų stabilumas labai mažėja rūgštinėje ir šarminėje terpėje. Matome, kad daugelis buferių neturi ypatingos įtakos stabilumui. Tačiau citratas ir karbonatas ryškiai destabilizuoja. Jų reikėtų vengti ruošiant šio baltymo tirpalus.

Iš pateiktų pavyzdžių matome, kiek daug informacijos galime gauti iš vieno eksperimento, kurio plokštelės paruošimas (jei reagentai paruošti iš anksto) užima mažiau kaip valandą. Automatizuotas eksperimentas užima apie valandą. Lieka duomenų analizė, kuri gali būti ilga, nes duomenų gaunama tikrai daug.

2. Fluorescencija ir spektrofotometrija ir jų taikymas baltymų tyrimams

2.1. Fluorescencijos spektroskopija

2.1.1. Bendrosios savokos

Šviesos emisija iš bet kokios medžiagos, vykstanti elektronui peršokant ar pereinant iš aukštesnio energijos lygmens į žemesnį, yra vadinama liuminescencija (*luminescence*). Liuminescencijos reiškiny yra skirstomas į dvi kategorijas – fluorescencijos ir fosforescencijos. Tai priklauso nuo sužadintosios būsenos savybių.

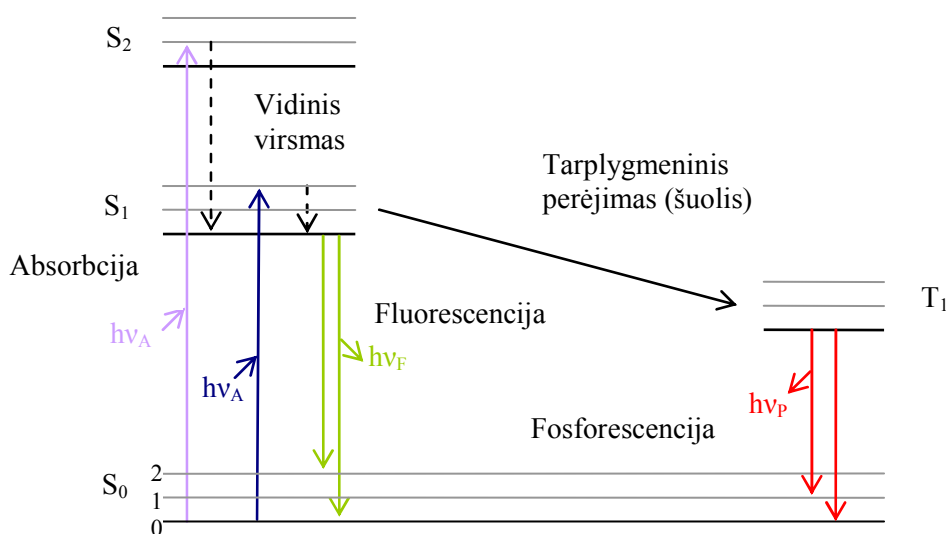
Fluorescencijos (*fluorescence*) atveju elektronas sužadintoje orbitalėje sudaro porą su antruoju priešingo sukinio elektronu nesužadintoje orbitalėje. Grįžimas į nesužadintąją orbitalę yra leistinas dėl priešingo sukinio ir vyksta greitai emituojant fotoną. Todėl fluorescencijos emisijos greičiai tipišškai siekia 10^8 s^{-1} , tai atitinka fluorescencijos gyvavimo periodą, lygų 10 ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$). Fluorescencijos gyvavimo periodas yra vidutinis laiko tarpas tarp sužadintosios ir nesužadintosios būsenų.

Fosforescencija (*phosphorescence*) yra šviesos emisija iš tripletinės sužadintosios būsenos, kai elektronas sužadintoje orbitalėje yra to paties sukinio kaip nesužadintasis elektronas. Tokiu atveju perėjimas ar šuolis (*transition*) į nesužadintąją būseną yra uždraustas, todėl emisijos greitis yra gana lėtas ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$), o tipiškas gyvavimo periodas trunka nuo milisekundžių iki sekundžių. Fosforescencija gali užtrukti ir daug ilgiau, pvz., tamsoje švytintys žaislai.

Skiriamoji riba tarp fluorescencijos ir fosforescencijos nėra visada aiški. Pavyzdžiui, pereinamųjų metalų kompleksuose su organiniais ligandais matomos mišrios singletinės-tripletinės būsenos. Jų gyvavimo periodai yra tarpiniai, nuo šimtų nanosekundžių iki mikrosekundžių. Per vieną nanosekundę šviesa nukeliauja apie 30 cm, o tam tikri fluoroforai pasižymi netgi gerokai trumpesniu gyvavimo periodu, kuris trunka nanosekundės dalis. Dėl tokių trumpų fluorescencijos gyvavimo periodų, norint pamatuoti emisijos spektrų priklausomybę nuo laiko, būtina sudėtinga aparatūra. Tačiau nuo laiko priklausanti fluorescencija (*time-resolved fluorescence*) dažnai naudojama, nes taip gaunama gerokai daugiau informacijos negu nagrinėjant pastovią fluorescenciją (*steady-state fluorescence*). Technologiniai laimėjimai jau įgalina naudoti nuo laiko priklausančią fluorescenciją netgi mikroskopuose.

Procesus, kurie vyksta tarp šviesos absorbcijos ir emisijos, dažniausiai aprašome Jablonskio diagrama. Profesorius Alexander Jablonski (1898-1980) laikomas vienu fluorescencijos mokslo kūrėju, jis aprašė koncentracinę depoliarizaciją ir anizotropiją. Profesorius dirbo tarpukario ir pokario Lenkijoje. Jablonskio diagrama parodyta 2.1 pav. Singletinės pagrindinės (*ground state*) pirmoji ir antroji elektronų būsenos parodytos ženklais S_0 , S_1 ir S_2 . Kiekviename šių elektroninių energijos lygmenų fluoroforai gali egzistuoti dar daugelyje vibracinių energijos lygmenų, parodytų skaičiais 0, 1, 2 ir t.t. Šioje supaprastintoje Jablonskio diagramoje neparodyta daugelio sąveikų, pvz., gesinimo (*quenching*), energijos perdavimo (*energy transfer*) ir sąveikos su tirpikliu. Vertikalios rodyklės rodo perėjimus tarp bū-

senų. Šviesos absorbcija yra ypatingai greitas procesas, trunkantis apie 10-15 ps, per kurį nepasislenka atomų branduoliai. Tai yra vadinamasis Franck-Condon principas.

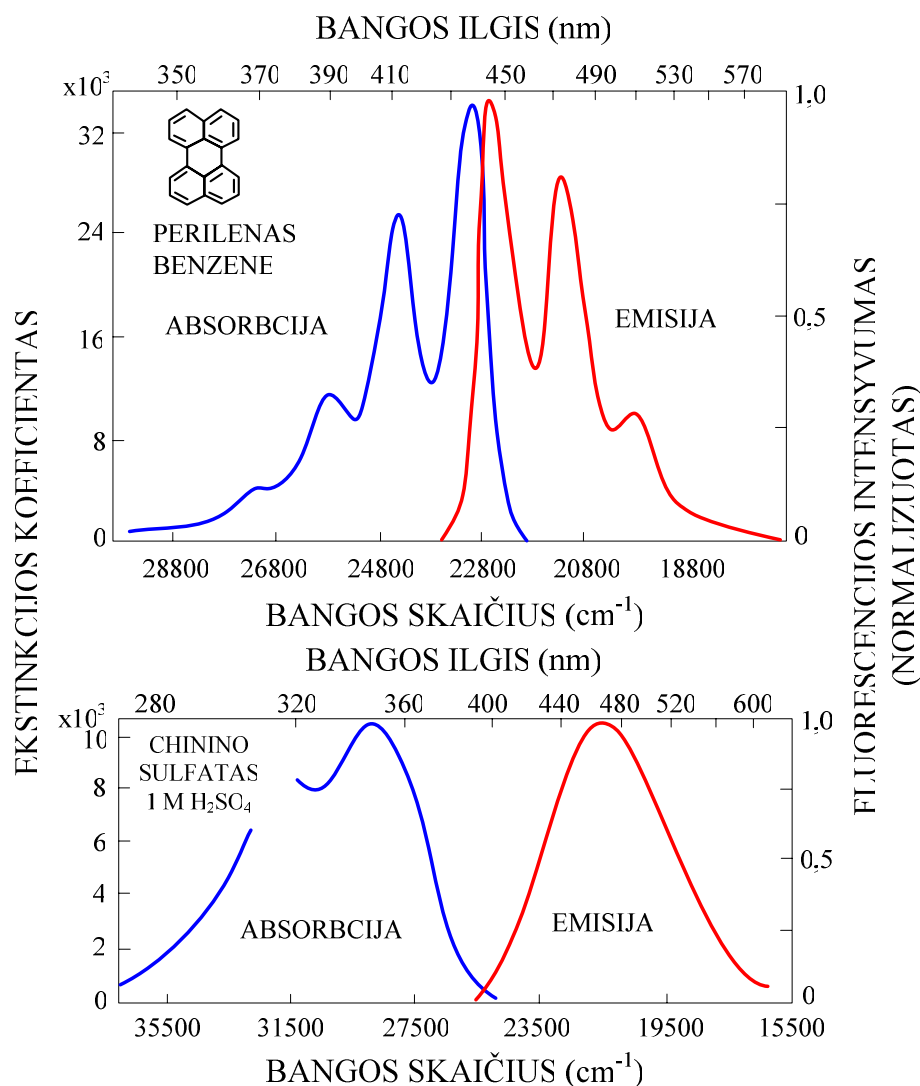


2.1 pav. Jablonskio diagrama, paaiškinanti fluorescencijos ir fosforescencijos reiškinius

Perileno emisijos spektras gerai pavaizduoja energijų skirtumus tarp įvairių vibracinių energijos lygmenų (2.2 pav.). Emisijos maksimumai, kurie atitinka vibracinės energijos lygmenis, yra nutolę vienas nuo kito maždaug 1500 cm^{-1} bangos skaičių. Kambario temperatūros terminės energijos neužtenka pakankamai prisotinti sužadintas vibracines būsenas. Absorbcija ir emisija vyksta molekulėse, pasižyminčiose mažiausia vibracine energija. Dideli energijų skirtumai tarp S₀ ir S₁ sužadintųjų būsenų yra per dideli termiškai prisotinti S₁. Taigi fluorescencijai sužadinti naudojame šviesą, o ne šilumą.

Atkreipkite dėmesį, kad x ašies dydžiai yra linijiniai pagal bangos skaičių, o ne pagal įprastinį bangos ilgį, kuris pažymėtas viršuje esančiose ašyse. Tai yra teisingesnis, atskleidžiantis fluorescencijos principą spektrų vaizdavimo būdas, nors šiuo metu jau nepopuliarus.

Po šviesos sugerties įvyksta keletas procesų. Fluoroforas yra paprastai sužadinamas į S₁ ar S₂ būsenų vieną aukštesnių vibracinių lygmenų. Molekulės, esančios kondensuotų fazių (skysčiai, kietos), greitai relaksuoja į S₁ būsenos žemiausią vibracinį lygį. Šis procesas yra vadinamas vidine konversija ir trunka greičiau negu 10^{-12} s. Fluorescencijos gyvavimo periodas paprastai trunka 10^{-8} s, vidinė konversija jau būna pasibaigusi iki emisijos pradžios. Taigi fluorescencijos emisija dažniausiai vyksta iš termiškai pusiausvirosios sužadintosios būsenos, tai yra iš žemiausios S₁ būsenos vibracinio lygmens.



2.2 pav. Perileno (viršuje) ir chinino sulfato (apačioje) sugerties (absorbcijos) ir emisijos spektrai

Grįžimas į pagrindinį lygį paprastai vyksta į aukštesnį vibracinį nesužadintosios būsenos lygmenį, o iš jo per 10^{-12} s pasiekia šiluminę pusiausvyrą. Dėl sugrįžimo į nežemiausią vibracinį S_0 būsenos lygmenį matome perileno emisijos spektro vibracinę struktūrą. Kita įdomi emisijos į aukštesnį vibracinį lygmenį pasekmė – fluorescencijos spektras atrodo kaip veidrodinis absorbcijos spektro ($S_0 \rightarrow S_1$ tranzicijos) vaizdas. Šis panašumas galimas, nes elektroninis sužadinimas nepakeičia branduolių išsidėstymo geometrijos. Sužadintosios būsenos vibracinių lygmenų išsidėstymas yra panašus į nesužadintosios būsenos.

Molekulės, esančios S_1 būsenos, gali pakeisti sukinį, pereidamos į pirmąją tripletinę būseną T_1 . Emisija iš T_1 ir yra vadinama fosforescencija. Jos emisijos spektras pasislinkęs į ilgesnių bangų ilgių (žemesnės energijos) dalį negu fluorescencijos emisijos spektras. Perėjimas iš S_1 į T_1 yra vadinamas tarpsisteminio persikryžiu (*intersystem crossing*). Tranzicijos iš T_1 į singletinę nesužadintąją būseną yra uždraustos, todėl tripleto emisijos greičio konstantos yra keliomis eilėmis mažesnės negu fluorescencijos. Molekulės, turinčios sunkiųjų atomų, pvz., bromo ar jodo, yra dažnai fosforescentiškos. Šie atomai padeda tarpsisteminiam kryžiavimuisi, todėl padidina fosforescencijos kvantinę išeigą.

Reiškinys, kad emituotos šviesos energija yra mažesnė (bangos ilgis ilgesnis) negu sugertos šviesos, yra vadinamas Stoukso poslinkiu (*Stokes shift*). Jį pirmą kartą pastebėjo George Stokes 1852 m. Keimbridžo universitete.

Fluorescencijos emisijos spektras paprastai nepriklauso nuo sužadinančios šviesos bangos ilgio. Tai yra vadinamoji Kašos taisyklė (*Kasha's rule*). Perėjusi į aukštesnius elektroninius ir vibracinius lygmenis perteklinė energija greitai (per 10^{-12} s) išsisklaido ir fluoroforas pasilieka S_1 būsenos žemiausiame vibraciniame lygmenyje.

2.1.2. Fluorescencijos gyvavimo periodai, kvantinė išeiga ir gesimas

Svarbiausios fluoroforo savybės yra jo fluorescencijos gyvavimo trukmė ir kvantinė išeiga. Kvantinė išeiga yra santykis tarp emituotų ir absorbuotų fotonų. Juo didesnė kvantinė išeiga, juo didesnė dalis absorbuotų fotonų gali sukelti fluorescenciją. Gyvavimo periodas nusako laiko tarpą, per kurį fluoroforas gali sąveikauti ar difunduoti savo aplinkoje ir suteikti informacijos per savo emisijos spektrą.

Kaip jau minėta, fluorescencijos kvantinė išeiga Q yra emituotų ir absorbuotų fotonų skaičių santykis. Jis priklauso nuo fluoroforo emisinio greičio konstantos Γ ir neemisinių procesų grupės greičio konstantos k_{nr} (nospinduliuojantis gesimas į S_0 , *non-radiative decay to S_0*):

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (1)$$

Kvantinė išeiga gali būti lygi beveik vienetui, jeigu nospinduliuojančio proceso greičio konstanta (k_{nr}) lygi beveik 0 ar daug mažesnė už spinduliuojančio $k_{nr} < \Gamma$. Reikia pažymėti, kad fluorescencijos energijos išeiga yra visada mažesnė už vienetą dėl Stoukso poslinkio.

Fluorescencijos sužadintosios būsenos gyvavimo periodas yra apibrėžiamas kaip vidutinis laiko tarpas, kurį molekulė praleidžia sužadintosios būsenos, prieš grįždama į nesužadintąją būseną. Tipiškų fluoroforų gyvavimo periodas τ lygus:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (2)$$

Fluorescencijos emisijos procesas yra atsitiktinis, todėl nedaugelis molekulių emituoja fotoną, praėjus laikui $t = \tau$ nuo sužadavimo. Vieneksponenčio gesimo (*single exponential decay*) procesą, aprašo lygtis

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}. \quad (3)$$

Jo fluorescencijos intensyvumas $I(t)$ mažėja laikui t kintant nuo maksimalios I_0 vertės ligi 0. Tada 63 proc. molekulių pereina į nesužadintąją būseną per laiko tarpą, mažesnę už gyvavimo periodą, o 37 proc. molekulių – per laiko tarpą, ilgesnį už gyvavimo periodą.

Eozinas ir eritrozinas B turi praktiškai vienodus spektrofotometrinius sugerties ekstinkcijos koeficientus, aprašytus vėliau, ir tokius pačius spinduliuojančio proceso greičius, tačiau labai skiriasi jų nespinduliuojančių gesimo procesų greičiai.

Fluoroforo gyvavimo periodas, jei nėra nespinduliuojančių gesimo procesų, vadinamas vidiniu, arba natūraliu gyvavimo periodu (*intrinsic or natural lifetime*):

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma}. \quad (4)$$

Šis gyvavimo periodas gali būti apskaičiuotas iš absorbcijos spektro, ekstinkcijos koeficiento ir emisijos spektro.

Fluorescencijos intensyvumas gali sumažėti dėl daugelio procesų, kurie vadinami fluorescencijos gesimu (*fluorescence quenching*).

Gesimas susiduriant (*collisional quenching*) įvyksta, kai sužadintosios būsenos fluoroforas yra deaktyvinamas, nes sąveikauja su tam tikra molekule, esančia tirpale, vadinama gesikliu (*quencher*). Įvairios molekulės gali tapti gesikliais susidurdamos, pvz., deguonis, halogenai, aminai ir molekulės, kurioms trūksta elektronų, pvz., akrilamidas. Pats gesinimo mechanizmas priklauso nuo konkrečios sąveikaujančios poros. Pavyzdžiui, akrilamidas gesina indolą dėl elektrono perėjimo iš indolo į akrilamidą. Gesinimas halogenais ir sunkiaisiais atomais vyksta dėl sukinio-orbitos sukibimo ir tarpsteminio perėjimo į tripletinę būseną.

Greta gesinimo susiduriant, fluorescencija gali būti gesinama dėl nefluorescuojančių kompleksų susidarymo tarp fluoroforo ir gesiklio ir daugelio kitų procesų.

2.1.3. Fluorescencijos anizotropija

Anizotropijos (*anisotropy*) matavimai dažnai naudojami fluorescencijos biocheminių tyrimų metu. Jie suteikia informacijos apie baltymų dydį ir formą ir apie molekulinės aplinkos lankstumą. Anizotropija yra naudojama baltymų-baltymų sąveikai, membranų judrumui įvertinti, ir įvairiems imunologiniams tyrimams.

Anizotropijos matavimai pagrįsti principu, kad poliarizuota šviesa atrankiai sužadinti fluoroforai pirmiausia absorbuoja fotonus, kurių elektriniai vektoriai eina paraleliai fluoroforo tranzicijos momentui. Tranzicijos momentas turi apibrėžtą orientaciją. Izotropiniame tirpale fluoroforai yra orientuoti atsitiktinai. Sužadinus juos poliarizuota šviesa, sužadinami tik tie, kurių absorbcijos tranzicijos dipolis yra nukreiptas paraleliai sužadinančios šviesos elektriniam vektoriui. Tokio sužadinimo pasekmė – fluorescencijos emisija taip pat yra iš dalies poliarizuota pagal fluoroforo ašį.

Fluorescencijos anizotropija (r) ir poliarizacija (P) yra apibrėžiamos:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}. \quad (5)$$

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (6)$$

Čia $I_{\parallel}$ ir $I_{\perp}$ yra vertikalios ir horizontalios poliarizuotos emisijos fluorescencijos intensyvumai, kai mėginys sužadinas vertikaliai poliarizuota šviesa. Anizotropija ir poliarizacija yra to paties reiškinio skirtingi aprašymai ir jos gali būti pakeistos viena kita, taikant formules

$$P = \frac{3r}{2 + r}. \quad (7)$$

$$r = \frac{2P}{3 - P}. \quad (8)$$

Pamatuotos anizotropijos vertės gali būti mažesnės negu maksimalios teorinės vertės. Dažniausiai tai įvyksta dėl rotacinės difuzijos, kuri vyksta sužadintosios būsenos gyvavimo trukmės laikotarpiu ir pakeičia fluoroforo emisijos dipolio kryptį. Šio parametro matavimai suteikia informacijos, kiek pakito kryptis nuo absorbcijos iki emisijos. Dauguma fluoroforų gerokai pasisuka tirpale per 50–100 ps. Todėl molekulės gali daug kartų pasisukti per 1–10 ns sužadintosios būsenos laikotarpį, o poliarizuoto sužadinimo emisija yra atsitiktinė. Taigi fluoroforų anizotropija neklampiam tirpale paprastai yra netoli nulio. Taip pat anizotropija gali labai sumažėti dėl sužadinimo perdavimų tarp fluoroforų.

Rotacinės difuzijos poveikis gali būti mažesnis prikabinant fluoroforą prie makromolekulės. Pavyzdžiui, žmogaus serumo albumino (HSA) rotacinės koreliacijos laikas yra apie 50 ns. Jei prie HSA prikabinamas fluoroforas, kurio gyvavimo periodas – 50 ns, tai anizotropija būtų apie 0,2. Mažesni baltymai turi trumpesnius koreliacijos laikotarpius, todėl anizotropijos būtų dar mažesnės. Prikabinus ilgo gyvavimo periodo fluoroforus, anizotropija gali būti maža, nors baltymas labai didelis. Svarbu, kad daugelio baltymų rotacinės koreliacijos laikai būtų lyginami su tipiškais fluoroforų fluorescencijos gyvavimo periodais. Todėl fluorescencijos anizotropija reaguoja į bet kokį veiksnį, kuris veikia rotacinės difuzijos laiką. Fluoroforų rotacijos laikai ląstelės membranoje taip pat vyksta nanosekundžių intervalu, o anizotropija yra jautri membranos sudėčiai. Dėl šių priežasčių fluorescencijos poliarizacija dažnai naudojama matuoti sąveiką tarp biologinių molekulių.

2.1.4. Fluorescencijos rezonansinės energijos perdavimas

Fluorescencijos sužadintosios būsenos rezonansinės energijos perdavimas (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) įvyksta, kai fluoroforo emisijos spektras (vadinamojo donoro) sutampa su kitos molekulės absorbcijos spektru (vadinamojo akceptoriaus). Akceptorius gali būti ir nefluorescenciškas, t.y. gali nebūti šviesos emisijos iš akceptoriaus. FRET metu nėra tarpinio fotono, kuris būtų emituotas iš donoro ir absorbuotas akceptoriaus. Tokie procesai vyksta, bet jie nėra FRET ir yra mažiau įdomūs mūsų atveju. FRET metu donoras ir akceptorius yra konjuguoti dipolio-dipolio sąveika. Dėl šios priežasties tiksliau būtų procesą vadinti RET (rezonansinės energijos perdavimu), o ne FRET, kuris yra įprastai naudojamas.

Energijos perdavimo dydis priklauso nuo fizinio atstumo tarp donoro ir akceptoriaus ir spektrinio persidengimo. Spektrinis persidengimas (donoro emisijos spektro ir akceptoriaus absorbcijos spektro persidengimas) yra aprašomas Fiorsterio atstumu R_0 . Atstumu r vienas nuo kito nutolusių donoro (D) ir akceptoriaus (A) energijos perdavimo greitis $k_T(r)$ yra

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6. \quad (9)$$

Čia τ_D yra donoro gyvavimo periodas, kai neperduodama energija. Vienos donoro-akceptoriaus poros energijos perdavimo veiksmingumas fiksuotu atstumu yra

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}. \quad (10)$$

Taigi energijos perdavimas priklauso nuo atstumo (r). Fiorsterio atstumai yra palyginami su biologinių makromolekulių dydžiais: 30-60 Å. Todėl energijos perdavimas yra kaip tam tikra „spektroskopinė liniuotė“ matuojant atstumus tarp įvairių baltymų vietų.

RET teorija yra sudėtinga. Ji skirtinga donorų ir akceptorių, kurie yra kovalentiškai sujungti, laisvi tirpale, arba apriboti geometriškai, pvz., membranose, ar prisijungę prie DNR. Be to, atsižvelgiant į donoro gyvavimo laiką, difuzija gali padidinti energijos perdavimo veiksmingumą, negu numatyta 10 lygtyje.

2.1.5. Nekintanti ir nuo laiko priklausoma fluorescencija

Fluorescencijos matavimai gali būti grubiai suskirstyti į nekintančią (nuo laiko nepriklausoma, *steady-state fluorescence*) ir nuo laiko priklausomą fluorescenciją (*time-resolved fluorescence*). Dažniausiai naudojami nekintančios fluorescencijos matavimai, kai apšviečiama nuolatine šviesa ir stebima nuolatinė nekintanti fluorescencija. Fluorescencija yra nanosekundžių procesas, tai ji praktiškai stebima iš karto po apšvietimo.

Antrasis būdas yra nuo laiko priklausomos fluorescencijos matavimas, kuris naudojamas pamatuoti fluorescencijos arba anizotropijos intensyvumo gesimą. Mėginys yra sužadinamas šviesos impulsu, kurio laikotarpis mažesnis negu gesimo periodas. Tada intensyvumo gesimas užrašomas didelio greičio detekcijos sistema, kuri leidžia anizotropijos intensyvumą matuoti ns laikotarpiais.

Taigi nekintančios fluorescencijos stebėjimai yra nuo laiko priklausančių reiškinių vidurkis. Pavyzdžiui, fluoroforo, kurio vienksoponentis intensyvumo gesimo laikas (τ) ir vienksoponentis rotacinės koreliacijos laikas (θ), intensyvumo bei anizotropijos gesimas yra:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}. \quad (11)$$

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta}. \quad (12)$$

Čia I_0 ir r_0 yra nulinio laiko $t=0$ intensyvumas ir anizotropija. Integruvę šias lygtis, galime apskaičiuoti nekintančios fluorescencijos matavimus. Nekintanti (*steady-state*) anizotropija (r) yra $r(t)$ vidurkis, padaugintas iš $I(t)$:

$$r = \frac{\int_0^{\infty} r(t) I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}. \quad (13)$$

Vardiklis normalizuoja anizotropiją, kad ji būtų nepriklausoma nuo bendro intensyvumo. Sudėję į šią lygtį priklausomybes nuo laiko, gauname Perino lygtį, kuri aprašo anizotropijos priklausomybę nuo teorinės anizotropijos (r_0), kai nėra rotacinės difuzijos ir rotacinės koreliacijos laiko (θ):

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\theta)}. \quad (14)$$

Panašiai ir nekintančios fluorescencijos (*steady-state*, SS) intensyvumas (I_{ss}) yra susijęs su gesimo laiku:

$$I_{ss} = \int_0^{\infty} I_0 e^{-t/\tau} dt = I_0 \tau. \quad (15)$$

Čia I_0 yra parametras, priklausantis nuo fluoroforo koncentracijos ir instrumento parametrų. Nekintančios fluorescencijos intensyvumas yra proporcingas gyvavimo laikotarpiui.

Matuojant tik nekintančią fluorescenciją, dauguma informacijos, kurią galėtume gauti iš fluorescencijos matavimo, yra prarandama vidurkinimo metu. Pavyzdžiui, anizotropijos gesimas yra dažniausiai ne vienaeksponentinis procesas ir daug pasako apie makromolekulės formą ir lankstumą.

Intensyvumo gesimas taip pat perduoda informaciją, kuri prarandama vidurkinant. Neretai makromolekulės gali egzistuoti ne vienos konformacijos, o prie jos prisijungusio fluoroforo gesimo laikas tų konformacijų yra skirtingas. Taip gali būti aptiktos dvi konformacijos. Nekintančios fluorescencijos matavimai pateiktų tik vidurkinę fluorescenciją.

Kai stebimas rezonansinės energijos perdavimas, intensyvumo gesimas daug pasako apie tai, kaip akceptoriai yra pasiskirstę aplink donorą. Laiko matavimai parodo, ar gesimą sukėlė difuzija ar kompleksų formavimasis su nesužadintosios būsenos fluoroforais.

2.1.6. Biocheminiai fluoroforai ir indikatoriai

Fluoroforai gali būti suskirstyti į dvi grupes: vidinius (*intrinsic*), kurie egzistuoja natūraliai ir išorinius (*extrinsic*), kurių pridedama į mėginį, neturintį reikiamų spektrinių savybių. Baltymų vyraujantis fluoroforas yra triptofano aminorūgšties indolo grupė. Jos absorbcijos maksimumas yra ties 280 nm o emisijos – ties 340 nm. Indolo emisijos spektras labai priklauso nuo tirpiklio poliariškumo. Indolo emisija gali pasislinkti į mėlynos spalvos spektro pusę, jei jis paslėptas natyvioje baltymo būsenoje, ir į raudonos spalvos pusę (ilgesnius bangos ilgius), kai baltymas yra išsivyniojęs.

Membranos paprastai neturi vidinės fluorescencijos. Todėl jos žymimos hidrofobiniais fluoroforais, pvz., difenilheksatrienu.

DNR turi aromatinės bazės, tačiau ji praktiškai nefluorescuoja. Tačiau daug katijoninių fluoroforų, pvz., akridinai, etidžio bromidas, jungiasi su DNR, padėdami DNR vaizdinimui.

Daug kitų biocheminių medžiagų yra fluoroforai, pavyzdžiui, redukuotas nikotinamido adenino dinukleotidas (NADH), oksiduoti flavinai (FAD, FMN), piridoksilfosfatas, ir chlorofilas.

Kai nagrinėjama medžiaga nefluorescuoja, kartais naudojamos kovalentiškai modifikuojančios medžiagos, pvz., dansilchloridas (DNS-Cl) ir fluoresceino izotiocianatas (FITC). Jie reaguoja su laisvomis amino grupėmis baltymuose bei fluorescuoja mėlynos (DNS) bei žalios (FITC) spalvos srityse.

Baltymus galima pažymėti ir per jų sulfhidrilines grupes, naudojant maleimidino reagentus, pvz., Bodipy 499/508. Jei norima ilgesnio bangos ilgio, naudojamas Texas raudonasis. Svarbu, kad fluoroforai pasižymėtų didele fluorescencijos išeiga, būtų stabilūs ir mažai veiktų tiriamojo baltymo struktūrą.

Sukurta daug fluorescencinių indikatorių, kuriais galima matuoti medžiagų koncentracijas tirpale, pvz., Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , O_2 , taip pat pH .

2.2. UV-VIS spektrofotometrija

2.2.1. Spektrofotometrijos praktiniai dėsningumai

UV-VIS spektrofotometrija yra vienas pagrindinių biocheminių matavimų metodų, kuriuos nagrinėja daugelis kursų, todėl tik trumpai pakartosime pagrindines spektrofotometrijos sąvokas ir panagrinėsime keletą praktinių pavyzdžių, kurie padės geriau suprasti ir fluorescenciją.

Daugelis cheminių medžiagų sugeria (absorbuoja) įvairios energijos (bangos ilgio) matomosios šviesos fotonus. Dėl nevienodo įvairių energijų kvantų sugėrimo junginiai būna spalvoti. Tai priklauso nuo cheminės struktūros. Absorbcijos ir fluorescencijos priklausomybę nuo cheminės struktūros panagrinėsime išsamiau.

Šviesos sugertį matuojame spektrofotometru, kuris realiai matuoja šviesos pralaidumą (transmisija, *transmittance*):

$$T = \frac{I}{I_0}. \quad (16)$$

Čia I – šviesos srautas, perėjęs pro mėginį, o I_0 – šviesos srautas, tomis pačiomis sąlygomis perėjęs per tą pačią kiuvetę su tuo pačiu tirpalu, bet be tiriamojo cheminio junginio.

Šviesos sugertis (absorbcija, *absorbance*, A) yra logaritmiškai ir atvirkščiai susijusi su pralaidumu:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right). \quad (17)$$

Spektrofotometras pakankamai tiksliai matuoja šviesos pralaidumą tarp 10 ir 90 proc., t.y. nuo $T=0,1$ iki $T=0,9$. Kai toks pralaidumas, absorbcija yra atitinkamai 0,046 ir 1,000. Tiksliausi matavimai,

kai $T=0,5$. Tada $A=0,301$. Kai pralaidumas yra 1 proc. arba 99 proc., tada $A=2$ ir $A=0,00436$. Tai yra praktinės ribos, kurių nevertėtų peržengti, norint pakankamai tiksliai pamatuoti šviesos sugertį. Šias sąvokas verta prisiminti, kai norime nustatyti matavimų paklaidą.

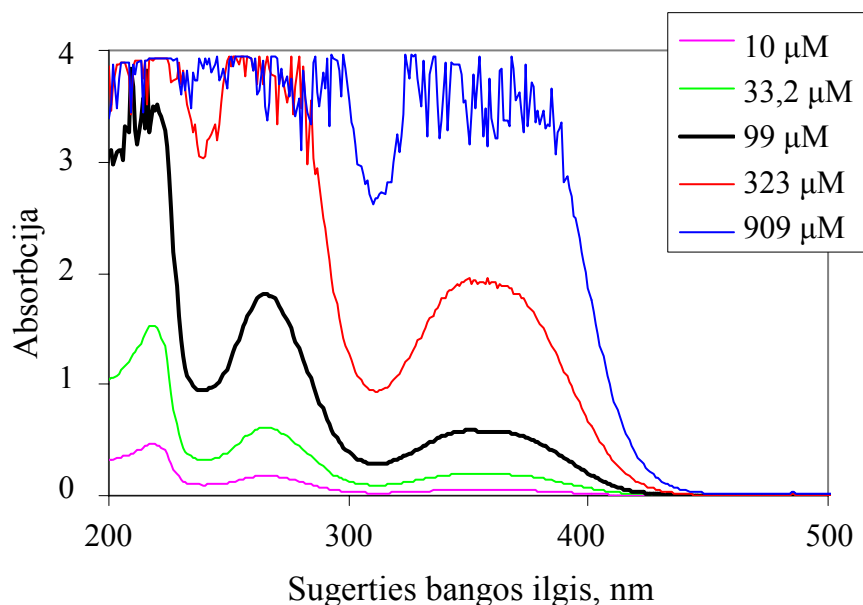
Šviesos sugerties priklausomybę nuo medžiagos ir jos koncentracijos aprašo Bero-Lamberto dėsnis:

$$A = \varepsilon_{\lambda} l c . \quad (18)$$

Čia ε_{λ} yra molinis ekstinkcijos koeficientas (*molar extinction coefficient*), l – šviesos kelio ilgis mėginio metu, o c – molinė šviesą sugeriančiojo cheminio junginio koncentracija. Dabartiniuose spektrofotometruose dažniausiai naudojama 1 cm šviesos kelio ilgio kiuvetė. Pagal susitarimą molinis ekstinkcijos koeficientas yra tokia sugertis, kuri nustatoma, kai kelio ilgis yra 1 cm, o koncentracija 1 M.

2.3 pav. rodo 1,8-anilinaftalino sulfonato (ANS) sugerties spektrus. Iš spektrų matome keletą svarbių priklausomybių. Pirma, sugerties spektras turi savo priklausomybės nuo bangos ilgio formą, kuri nepriklauso nuo koncentracijos ir šviesos nueito kelio. Tai yra kaip ir medžiagos parašas. Norint įsitikinti medžiagos grynumu ar identifikuoti, galima naudoti absorbcijų santykius tarp pasirinktų bangos ilgių. Absorbcijos pasirinktuose bangos ilgiuose santykiai išlieka pastovūs.

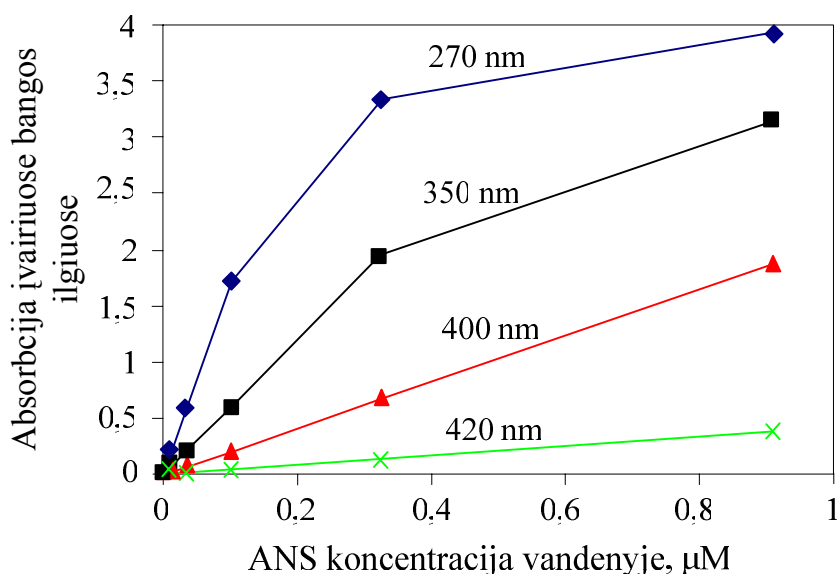
Antra, sugertys, didesnė negu 2, negali būti tiksliai pamatuotos. Juo sugertis didesnė, juo didesnis triukšmas. Jis labai didelis, kai sugertis artėja prie 4.



2.3 pav. 1,8-ANS sugerties spektrai vandenyje esant įvairioms ANS koncentracijoms. ANS buvo atsverta ir ištirpinta vandenyje, taip paruoštas pradinis tirpalas. Vėliau įvairios koncentracijos paruoštos skiedžiant. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 1–5 proc.

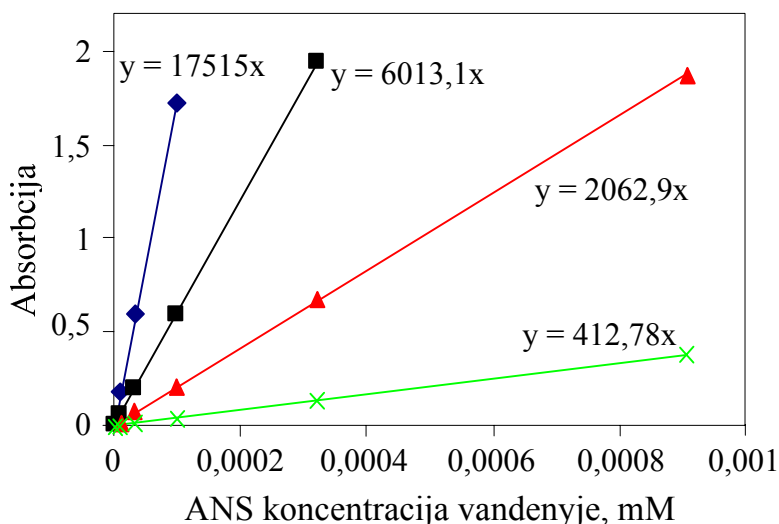
2.4 pav. matome, jog absorbcijos priklausomybės įvairiuose bangos ilgiuose yra nevienodos. Priklausomybės yra tiesinės, kai absorbcija mažesnė už 2. Didėjant absorbcijai, mėginys tampa vis labiau

nepralaidus. Kai absorbcijos vertės didesnės nei 2, prietaisas tiksliai nebuvo nustato praleistos šviesos. Todėl priklausomybės tampa nebetiesinės, o asimptotiškai artėja prie 4.



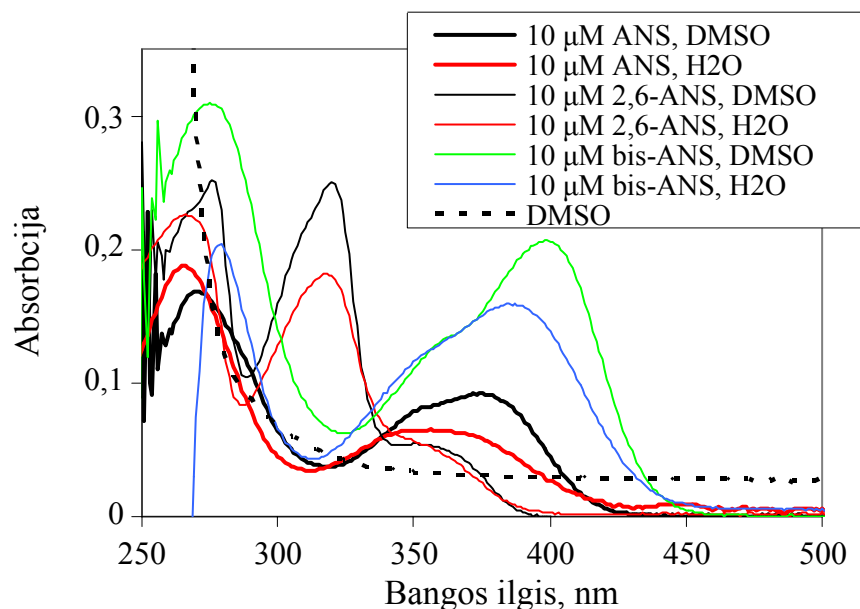
2.4 pav. 1,8-ANS sugerties vandenyje priklausomybės esant įvairiems bangos ilgiams ir įvairioms ANS koncentracijoms. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 1–5 proc.

2.5 pav. matome, kad bet kuriame bangos ilgyje galime rasti priklausomybės nuo koncentracijos tiesinę sritį. Priklausomybės pokrypio kampas yra lygus moliniam ekstinkcijos koeficientui. Kitaip tariant $\varepsilon_{270}=17.515 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{350}=6.013 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{400}=2.063 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{420}=413 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Patogu žinoti keletą tos pačios medžiagos ekstinkcijos koeficientų. Jei koncentracija gana didelė, tai tinka koeficientas tokio bangos ilgio, kur absorbcija yra tarp 0,05 ir 1,00.



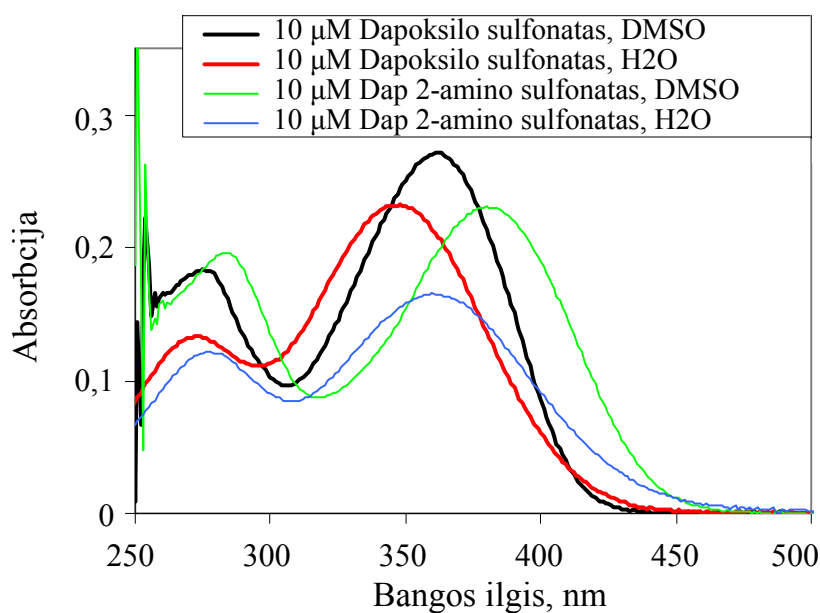
2.5 pav. 1,8-ANS ekstinkcijos koeficientų vandenyje nustatymas. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 1–5 proc.

Žemiau esančiuose paveiksluose parodyti dažniau naudojamų fluoroforų absorbcijos spektrai. Matome, kad ANS absorbcija DMSO tirpiklyje yra maksimali maždaug ties 375 nm, o vandenyje – ties 350 nm (stebint tik didžiausio bangos ilgio sugerties dalį). Tai yra nedidelis skirtumas, palyginti su šių tirpiklių fluorescencija (žr. vėlesnės dalis). Fluoroforų struktūros parodytos 2.1 lentelėje.



2.6 pav. 1,8-ANS, 2,6-ANS ir bis-ANS absorbcijos spektrai vandenyje ir DMSO, kai jų koncentracija lygi 10 μ M. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 1–5 proc.

DMSO spektras parodytas, kai palyginamojoje kiuvetėje yra vanduo. Junginių spektrai DMSO išmatuoti, kai palyginamojoje kiuvetėje irgi yra DMSO. Staigus DMSO sugerties didėjimas apie 270 nm paaiškina duomenų triukšmą apie 250 nm.



2.7 pav. Dapoksilo sulfonato ir dapoksilo 2-aminoetilsulfonamido absorbcijos spektrai vandenyje ir DMSO, kai jų koncentracija lygi 10 μ M. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 1–5 proc.

2.7 pav. lyginami dapoksilo sulfonato ir dapoksilo 2-aminoetilsulfonamido absorbcijos spektrai vandenyje ir DMSO. Didelių skirtumų tarp šių spektrų nėra. Priklausomybė nuo tirpiklio taip pat gana nežymi.

2.3. Sugerties ir fluorescencijos ryšys su struktūra

2.3.1. Fluoroforų konstravimas

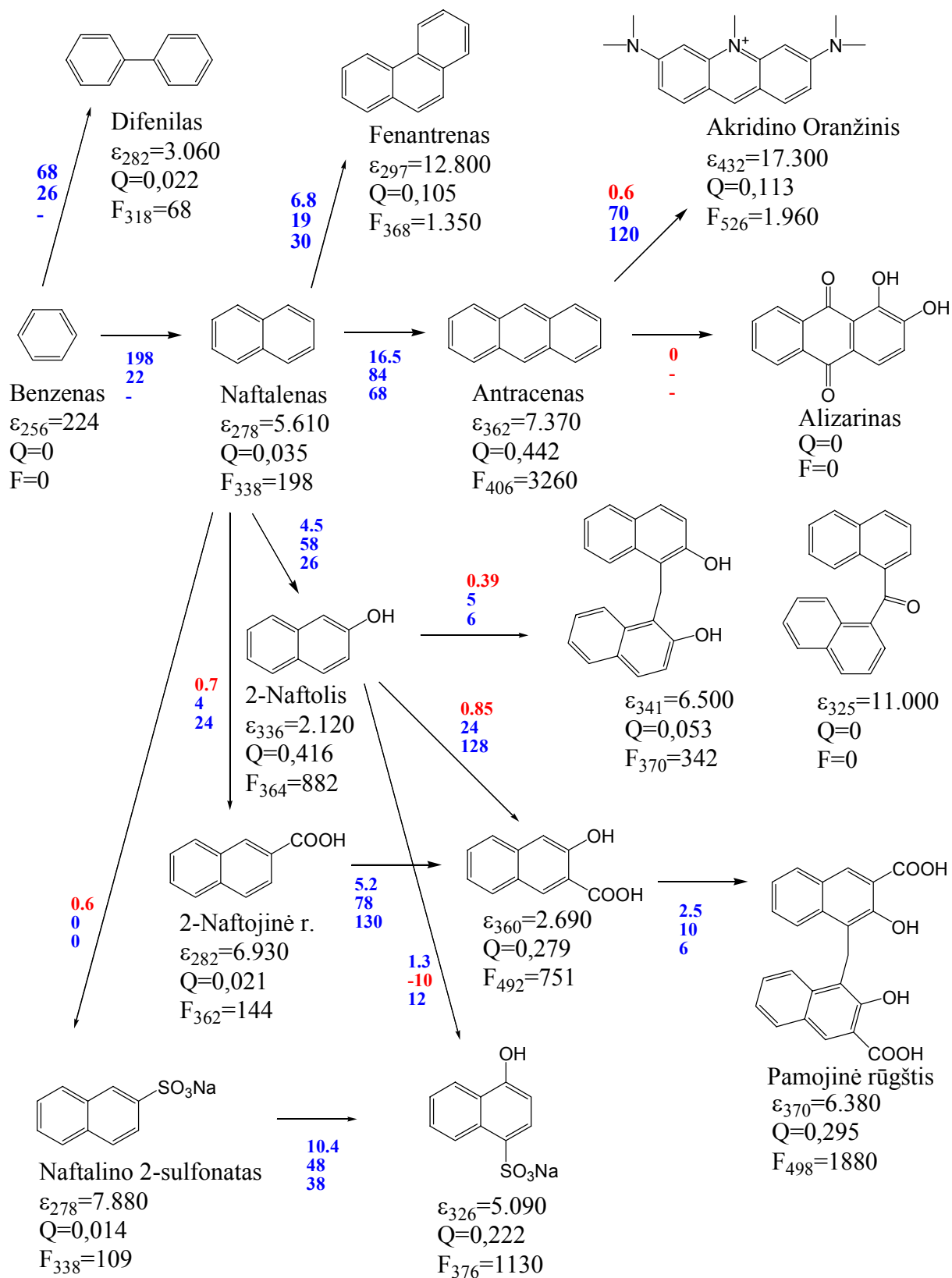
Šiame skyrelyje norėčiau apžvelgti tam tikrų mus dominančių junginių absorbcijos ir fluorescencijos koreliacijas su chemine struktūra. Dažnai būna minima sąvoka struktūros-aktyvumo koreliacija (structure-activity relationship, SAR; quantitative structure-activity relationship, QSAR), arba struktūros-energijos koreliacija. Žemiau esanti schema (2.8 ir 2.9 pav.) yra kaip cheminis konstruktorius, kuriuo naudojantis konstruojami reikiamo absorbcijos ir emisijos bangos ilgio, ekstinkcijos koeficiento, kvantinės išeigos cheminiai junginiai – fluoroforai.

Cheminį konstravimą pradedame nuo benzeno ir prijungiamo įprastines funkcines grupes, kol pasiekiamo gerai fluorescuojančius junginius, kurie mus domina, pvz., 1,8-anilino naftalino sulfonata, pamojinę rūgštį, bis-ANS ar TNS. Tarp panašių cheminių struktūrų, einant nuo paprastesnės link sudėtingesnės, brėžiame rodyklę, šalia kurios parašyti skaičiai rodo, kaip pakito mus dominančios savybės.

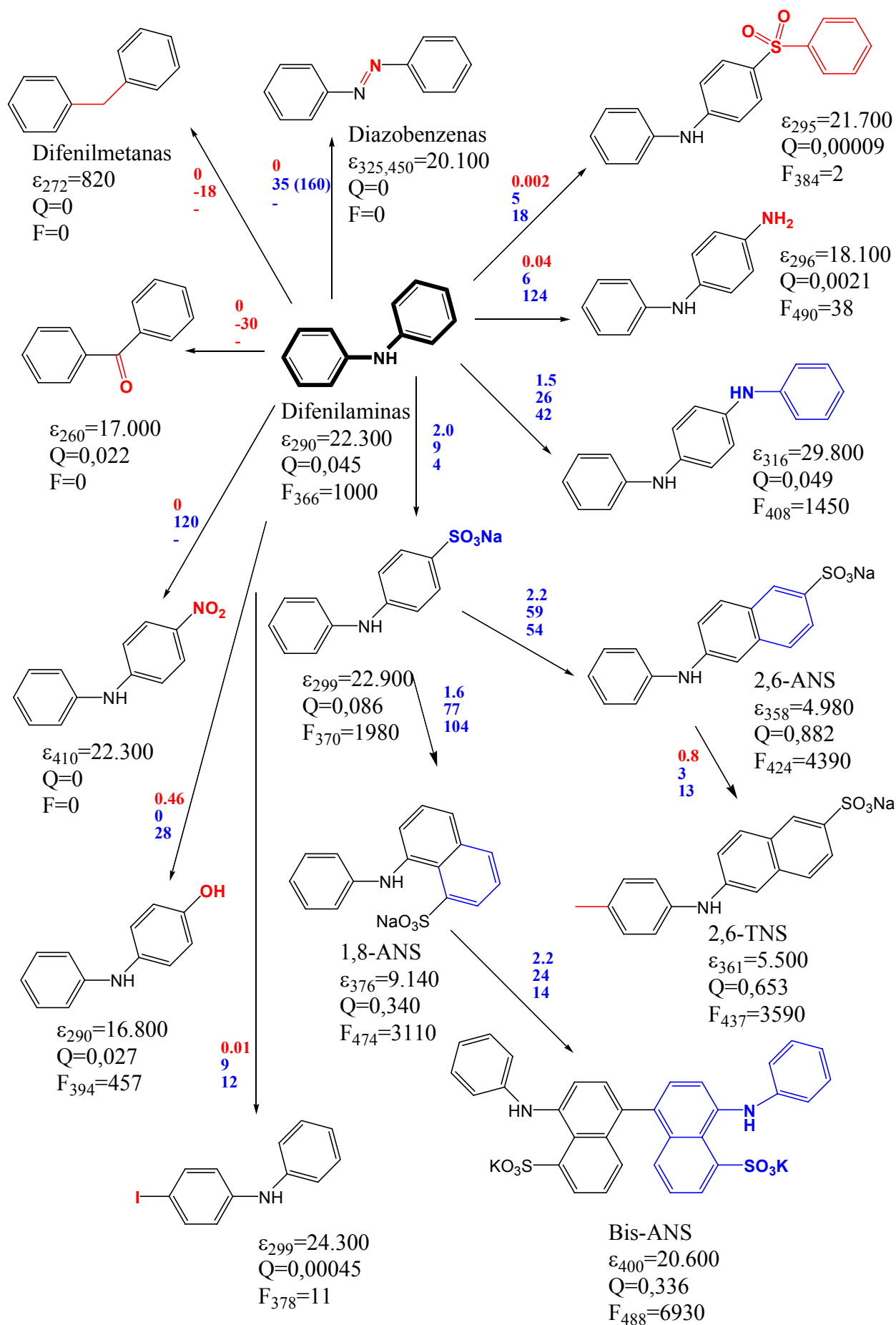
Pirmasis skaičius šalia cheminių junginių rodo ekstinkcijos koeficientą pasiekus sugerties maksimumą, antrasis skaičius rodo junginio fluorescencijos kvantinę išeigą vieneto dalimis, trečiasis skaičius rodo fluorescencijos išeigą, kuri lygi ekstinkcijos koeficiento ir fluorescencijos kvantinės išeigos sandaugai:

$$F_{\lambda_{\text{emisijos}}} = \varepsilon_{\lambda_{\text{absorbcijos}}} Q. \quad (19)$$

Subskribtas rodo emisijos maksimumo bangos ilgį. Visi skaičiai buvo autoriaus pamatuoti, paklaida yra apie 2–5 proc.



2.8 pav. Fluoroforų konstravimas iš benzeno. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 1–5 proc.



2.9 pav. Fluoroforų konstravimas iš difenilamino. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 1–5 proc.

2.9 pav. pavaizduota, kaip šviesos sugertis ir fluorescencija kinta nuo difenilamino iki ANS ir bis-ANS fluoroforų. Difenilaminas turi didelį ekstinkcijos koeficientą 290 nm bangos ilgyje, tačiau gana nežymią kvantinę išeigą (apie 4,5 proc., vieneto dalimis – 0,045). Todėl fluorescencijos išeiga yra vidutinė ($F_{366} = 1.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Sulfonato grupės para padėties prijugimas beveik neturi įtakos sugerčiai, tačiau padidina kvantinę išeigą dvigubai, todėl fluorescencijos išeiga padidėja dvigubai – iki 1.980. Benzeno žiedo pakeitimas naftalinu stipriai paveikia kvantinę išeigą, tačiau šio bangos ilgio (358 nm) ekstinkcijos koeficientas yra gerokai mažesnis, todėl net ir esant 88 proc. kvantinei išeigai fluorescencijos išeiga padidėja tik dvigubai – iki 4.390. 2,6-ANS yra veiksmingiausias fluoroforas iš schemoje parodytų, tačiau kitų privalumų daugiau turi 1,8-ANS ir yra dažniausiai naudojamas. Jo kvantinė išeiga yra gerokai mažesnė.

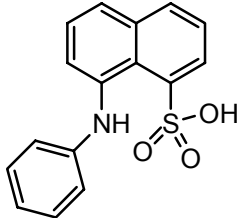
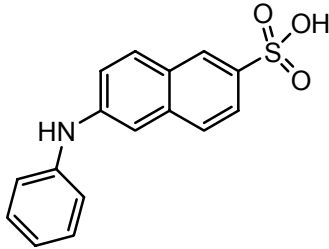
Pereinant nuo 1,8-ANS į bis-ANS, padvigubėja fluorescencijos ir absorbcijos savybės. Tai rodo, kad bis-ANS nėra gerai konjuguota sistema. Naftalino žiedai dėl sterinių trukdymų yra gerokai pasisukę vienas kito atžvilgiu ir elektronai laisvai nepereina iš vienos žiedų sistemos į kitą.

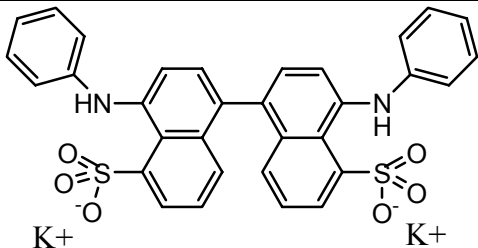
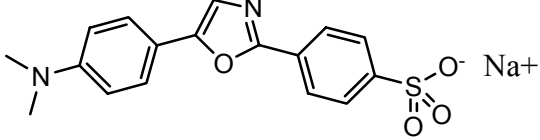
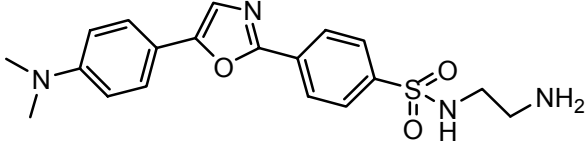
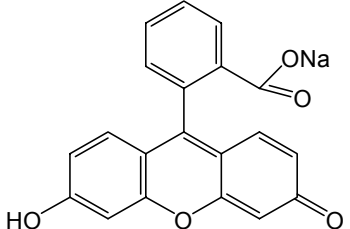
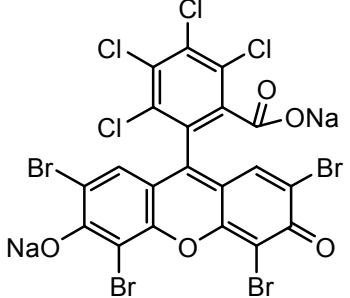
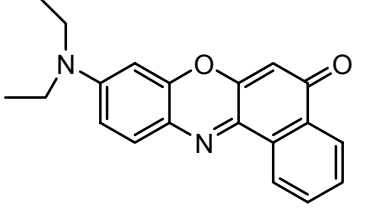
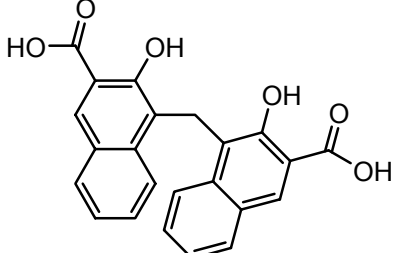
Sumuojant funkcinį grupių indėlį fluorescencijai, matome, jog hidroksilo ir sulfonato grupės gali gerokai padidinti fluorescenciją, nors dažniausiai jos neveikia. Amino, karboksilo ir metilo grupės menkai veikia fluorescenciją. Diazo ir nitrogrupės visiškai panaikina, o karbonilo grupė beveik panaikina fluorescenciją.

2.3.2. Solvatochromija

Fluorescencija labai priklauso nuo tirpiklio, o sugertį tirpiklis daug mažiau veikia. Tokie fluoroforai kaip 1,8-ANS šimtus kartų labiau fluorescuoja organiniuose tirpikliuose negu vandenyje. ANS vandenyje praktiškai nefluorescuoja, nes vanduo jo fluorescenciją gesina. ANS absorbcijos spektro forma nedaug skiriasi vandenyje ir organiniuose tirpikliuose. Įdomu, jog fluorescencija yra didelė ir mažai skiriasi tokiuose skirtinguose tirpikliuose kaip etanolis, DMSO ir heksanas. Mažas vandens kiekis taip pat praktiškai nesumažina ANS fluorescencijos.

2.1 lentelė. Svarbesnės fluoroforų struktūros ir aprašytos savybės, svarbios toliau aptariant šių junginių fluorescentines savybes ir pritaikomumą biofizikai

Fluoroforo cheminė struktūra	Fluoroforo savybės
	1,8-anilino naftalino sulfonatas (1,8-ANS; ANS) $\epsilon_{376}(\text{DMSO}) = 9.140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\epsilon_{356}(\text{H}_2\text{O}) = 6.470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $Q_{492}(\text{DMSO}) = 0,340$ $F_{474}(\text{DMSO}) = 3.110 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $S_{492}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 0,13 \text{ proc.}$
	2,6-anilino naftalino sulfonatas (2,6-ANS) $\epsilon_{353}(\text{DMSO}) = 5.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\epsilon_{350}(\text{H}_2\text{O}) = 5.660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $Q_{424}(\text{DMSO}) = 0,882$ $F_{424}(\text{DMSO}) = 4.390 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $S_{422}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 0,34 \text{ proc.}$

Fluoroforo cheminė struktūra	Fluoroforo savybės
	Bis-anilino naftalino sulfonatas (Bis-ANS) $\epsilon_{398}(\text{DMSO}) = 20.690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{384}(\text{H}_2\text{O}) = 15.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $Q_{488}(\text{DMSO}) = 0,336$ $F_{488}(\text{DMSO}) = 6.930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $S_{488}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 0,16 \text{ proc.}$
	Dapoksilo sulfonatas $\epsilon_{364}(\text{DMSO}) = 27.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{347}(\text{H}_2\text{O}) = 23.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $Q_{492}(\text{DMSO}) = 0,320$ $F_{492}(\text{DMSO}) = 8.630 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $S_{492}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 0,47 \text{ proc.}$
	Dapoksilo-2-aminoetilsulfonamidas $\epsilon_{380}(\text{DMSO}) = 23.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{369}(\text{H}_2\text{O}) = 16.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $Q_{560}(\text{DMSO}) = 0,084$ $F_{560}(\text{DMSO}) = 1.930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $S_{560}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 0,38 \text{ proc.}$
	Fluoresceinas $\epsilon_{521}(\text{DMSO}) = 111.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{488}(\text{H}_2\text{O}, 0,1 \text{ M NaOH}) = 102.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $Q_{510}(\text{H}_2\text{O}, 0,1 \text{ M NaOH}) = 0,95^*$ $F_{510}(\text{H}_2\text{O}, 0,1 \text{ M NaOH}) = 97.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $S_{488-510}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = \sim 90 \text{ proc.}^*$
	Cianozinas, floksinas B $\epsilon_{557}(\text{DMSO}) = 127.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{539}(\text{H}_2\text{O}) = 102.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $Q_{557}(\text{DMSO}) = 0,064$ $F_{557}(\text{DMSO}) = 8.090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $S_{539-557}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 41 \text{ proc.}^*$ $S_{570}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 2,3 \text{ proc.}$
	Nilo raudonasis $\epsilon_{552}(\text{DMSO}) = 26.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{550}(\text{H}_2\text{O}) = 5.970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $Q_{625}(\text{DMSO}) = 0,008$ $F_{625}(\text{DMSO}) = 234 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $S_{631}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 0,35 \text{ proc.}$
	Pamojinė rūgštis $\epsilon_{367}(\text{DMSO}) = 6.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{364}(\text{H}_2\text{O}) = 6.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $Q_{498}(\text{DMSO}) = 0,295$ $F_{498}(\text{DMSO}) = 1.880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $S_{492}(\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}) = 2,4 \text{ proc.}$

Solvatochromija yra fluorescencijos priklausomybė nuo tirpiklio. Skaitmeniškai ją galima išreikšti kaip fluorescencijos išeigų santykį dviejuose tirpikliuose. Mus domina, kaip įvairūs fluoroforai fluo-

rescuoja prisijungę prie įvairių baltymų paviršių, kurie bendruoju atveju gali būti arba hidrofiliniai, arba hidrofobiniai, todėl nagrinėjame fluorescenciją vandenyje ir pasirinktame tirpiklyje, dažniausiai DMSO. DMSO nėra hidrofobinis tirpiklis, tačiau jis dažniausiai negesina fluorescencijos ir jame fluoroforai elgiasi kaip organinėje aplinkoje.

Šioje 2.1 lentelėje pateiktos solvatochromijos vertės yra gautos padalijant fluorescencijos išėigas vandenyje iš fluorescencijos išėigų DMSO:

$$S_{\lambda} = \frac{F_{\lambda}(H_2O)}{F_{\lambda}(DMSO)}. \quad (20)$$

Čia λ yra fluorescencijos išėigos maksimumas DMSO tirpiklyje. Toks solvatochromijos pateikimas sudaro galimybę įvertinti, kiek fluoroforas galės maksimaliai atskirti hidrofobinę aplinką nuo hidrofilinės, kai jis sužadinamas esant hidrofobinės aplinkos sužadinimo maksimumui, ir fluorescencija detektuojama esant hidrofobinės aplinkos emisijos maksimumui.

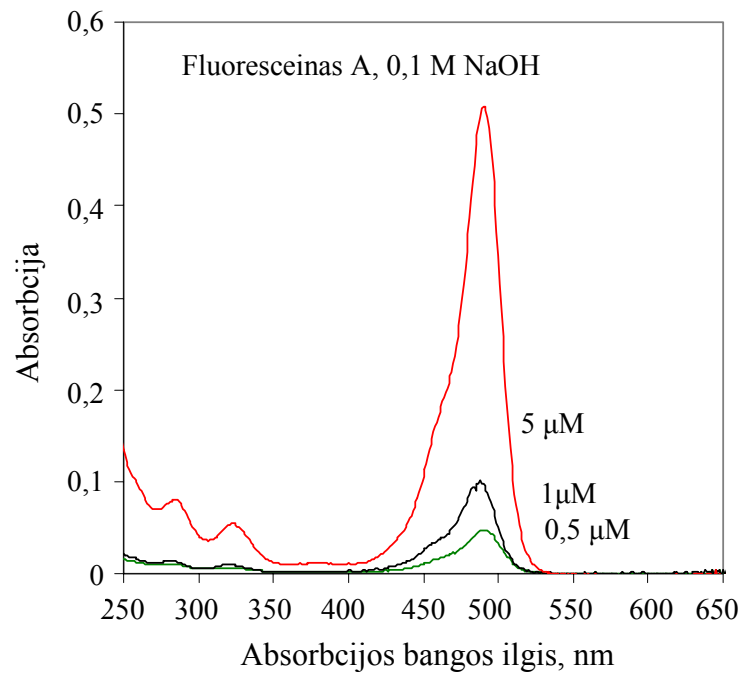
Panagrinėkime cianozino pavyzdį. Kvantinė išėiga vandenyje yra 41 proc. kvantinės išėigos DMSO ($S_{539-557}(H_2O/DMSO) = 41$ proc.), jeigu įvertintume visą smailės plotą ir tai, kad jų padėtyse vandenyje ir DMSO šiek tiek skiriasi. Tačiau jeigu sužadintume DMSO, pasiekus maksimumą, ir emisiją matuotume ten, kur yra maksimalus skirtumas tarp emisijos vandenyje ir DMSO, tai gautume solvatochromiją tik apie 2 proc. ($S_{570}(H_2O/DMSO) = 2,3$ proc.), nes šiame bangos ilgyje emisijos spektrai menkai persikloja. Tai yra svarbu nagrinėjant fluoroforo parinkimą terminio poslinkio metodui, kai nustatome baltymo-ligando jungimosi konstantas arba matuojame baltymo stabilumą.

2.3.3. Fluorimetro kalibravimas norint apskaičiuoti fluorescencijos kvandinę išėigą

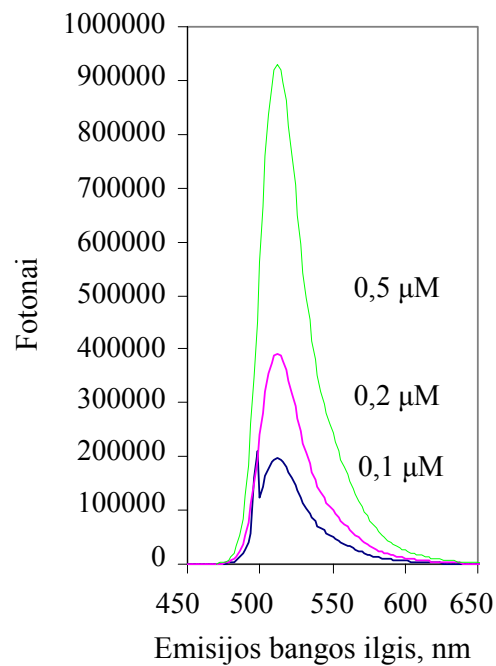
Fluorimetro matuojami fluorescencijos duomenys paprastai straipsniuose pateikiami neapibrėžtais vienetais (*arbitrary units*). Taip yra todėl, kad matuojami yra šviesos kvantai (*counts*). Jų skaičius labai priklauso nuo fluorimetro fotodaugintuvo savybių, šviesos šaltinio, bangos ilgio. Taigi rezultatas priklauso nuo individualaus aparato. Bet, sprendžiant fluoroforų cheminio konstravimo uždavinį, verta savo fluorimetą kalibruoti.

2.1 lentelėje pateiktos kvantinės išėigos, apskaičiuotos kalibravus fluorimetro matuojamų emituo-
tų fotonų skaičių su žinomos kvantinės išėigos fluoroforu. Kaip standartas buvo naudojamas fluoresceinas, kurio kvantinė išėiga yra 95 proc. 0,1 M natrio šarme.

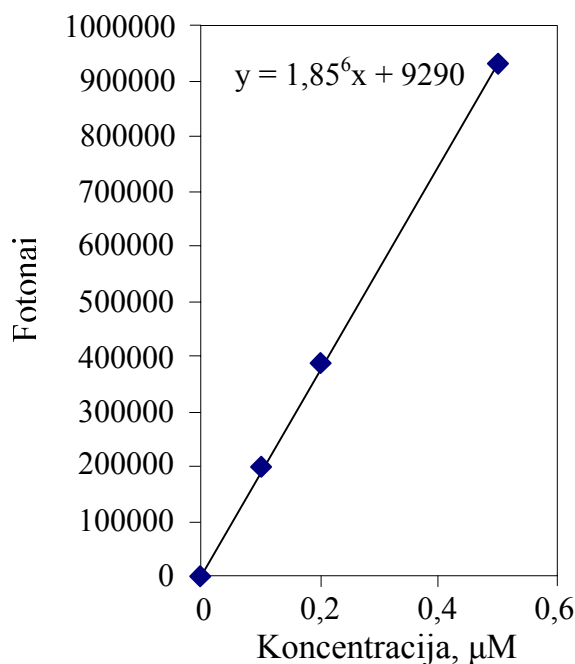
2.10 pav. parodytas fluoresceino absorbcijos spektras 0,1 M natrio šarme. Ruošdami keletą tirpalų, įsitikiname, jog yra linijinės absorbcijos priklausomybės nuo koncentracijos sritis.



2.10 pav. Fluoresceino A absorbcijos spektrai. Paruošiami keli įvairios koncentracijos tirpalai, rodantys, kad pasiekus absorbcijos maksimumą yra linijinė absorbcijos priklausomybė nuo koncentracijos



2.11 pav. Fluoresceino A fluorescencijos spektrai 0,1 M NaOH tirpale esant įvairioms fluoresceino koncentracijoms. Duomenys autoriaus. Paklaida – iki 5 proc.



2.12 pav. Fluoresceino A detektuatų fotonų skaičiaus priklausomybė nuo koncentracijos

Fotonų skaičius priklauso nuo daugelio fluorimetro parametrų, pvz., fotodaugintuvo savybių, spindulio plyšio pločių ir kt. Iš fotonų skaičiaus priklausomybės nuo fluoresceino koncentracijos sudarome kvantinės išeigos apskaičiavimo formulę:

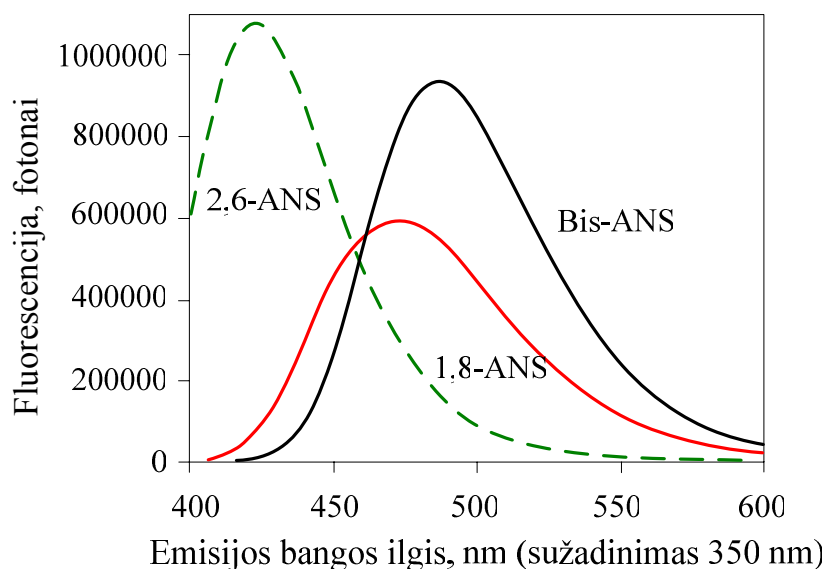
$$Q_{\max} = \frac{\text{Fotonai } 10 \mu\text{M tirpale}}{245 \times \varepsilon_{\text{sužadavimo } \lambda}}.$$

Čia {fotonai 10 μM tirpale} yra fluorimetro nustatytas fotonų skaičius. Kai kvantinė išeiga yra žinoma (fluoresceino ji yra 95 proc.), tada galime koreliuoti fotonų skaičių su kvantine išeiga. Tiesa, toks kvantinės išeigos apskaičiavimas yra ne visai tikslus, nes kvantinė išeiga yra proporcinga ne smailių aukščiui spektruose, o smailių plotui. Tačiau praktiškai apskaičiuoti smailės plotą yra sudėtinga, nes neaiškios spektrinės smailės ribos. Fluoresceino atveju ir absorbcijos, ir emisijos smailės yra gana aiškiai apibrėžtos, tačiau daugelio nagrinėtų fluoroforų įvairių energijų smailės yra persidengusios.

Taip pat pažymėtina, kad fluorimetro sužadavimo lempos spektras ir fotodaugintuvo (detekcijos) spektras nėra visiškai nepriklausomi nuo bangos ilgio. Paprastai sužadavimo lempos turi skleidžiamos šviesos vietinius maksimumus ir bendrą tendenciją skleisti daugiau šviesos apie 500 nm. Toks spektro netolygumas gali sukelti papildomą paklaidą koreliuojant fluorescentinius fotonus ir fluorescencijos išeigą. Todėl aukščiau pateiktus duomenis reikėtų naudoti kaip bendrą metodinį vadovą, o ne tikslų reikšmių rinkinį.

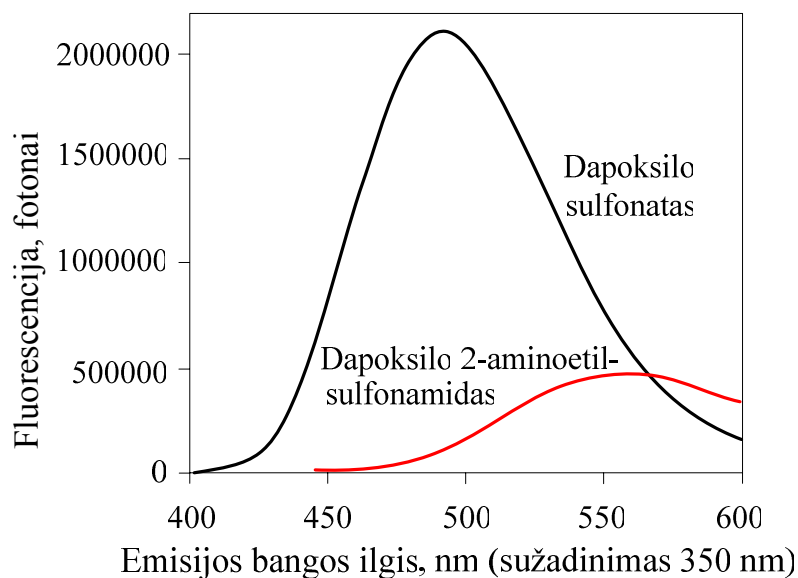
2.3.4. Anilinaftalino sulfonato fluorescencijos spektrai

2.13 ir 2.14 pav. parodyti kelių fluoroforų emisijos spektrai. Matome didelius skirtumus tarp 2,6-ANS ir 1,8-ANS ir daug mažesnius skirtumus tarp 1,8-ANS ir bis-ANS, čia bis-ANS atrodo kaip dvigubasis ANS spektras.



2.13 pav. 1,8-ANS, 2,6-ANS ir bis-ANS fluorescencijos spektrai, kai koncentracija 10 μM

Taip pat yra didelis skirtumas tarp dapoksilo sulfonato ir dapoksilo 2-aminoetil-sulfonamido. Pastarojo spektras yra palyginti platesnis ir pasislinkęs į ilgujų bangų pusę (2.14 pav.).

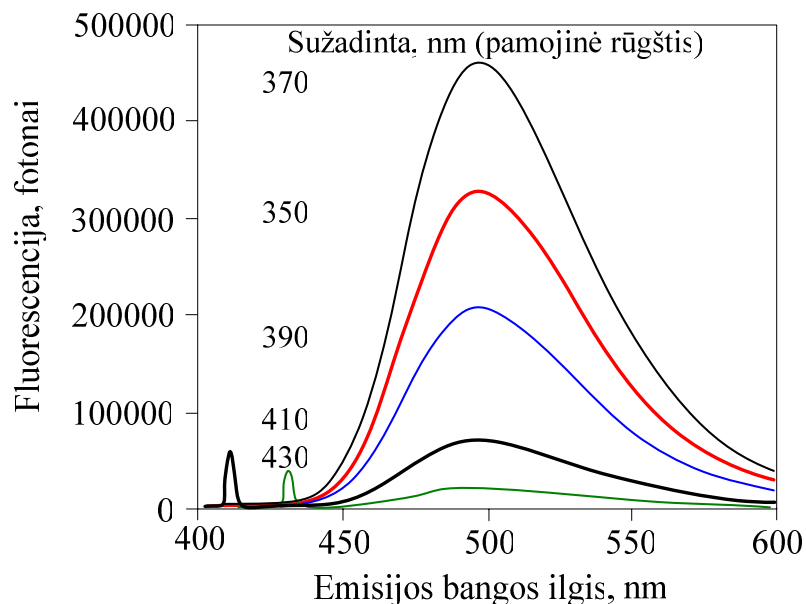


2.14 pav. Dapoksilo sulfonato ir dapoksilo 2-aminoetilsulfonamido fluorescencijos spektrai, kai koncentracija 10 μM

2.15 pav. pavaizduoti pamojinės rūgšties emisijos spektrai, gauti sužadinus įvairių bangos ilgių šviesa. Veikia du pagrindiniai fluorescencijos dėsniai. Pirma, emisijos spektro forma nepriklauso nuo sužadinimo bangos ilgio. Antra, sužadinant tų bangos ilgių šviesa, kur didesnis absorbcijos ekstinkci-

jos koeficientas, t.y. sugerama daugiau energijos, emisija yra proporcingai didesnė. Taip galima fluorimetru nustatyti fluoroforo absorbcijos spektrą.

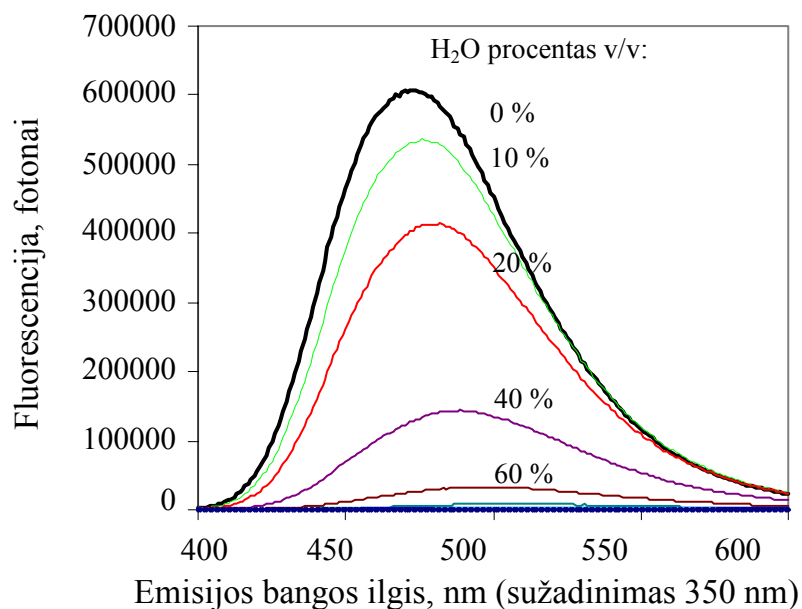
Taip pat atkreipiame dėmesį į du mažus pikus, kurie atsiranda sužadinus 410 ir 430 nm bangos ilgio šviesa. Šie maži pikai yra tiesiogiai patenkančios išbarstytos šviesos (*scattered light*) atspindžiai. Tai nėra fluorescencijos išeiga, o tik nuo paviršių atsispindėjusi ir užfiksuota šviesa.



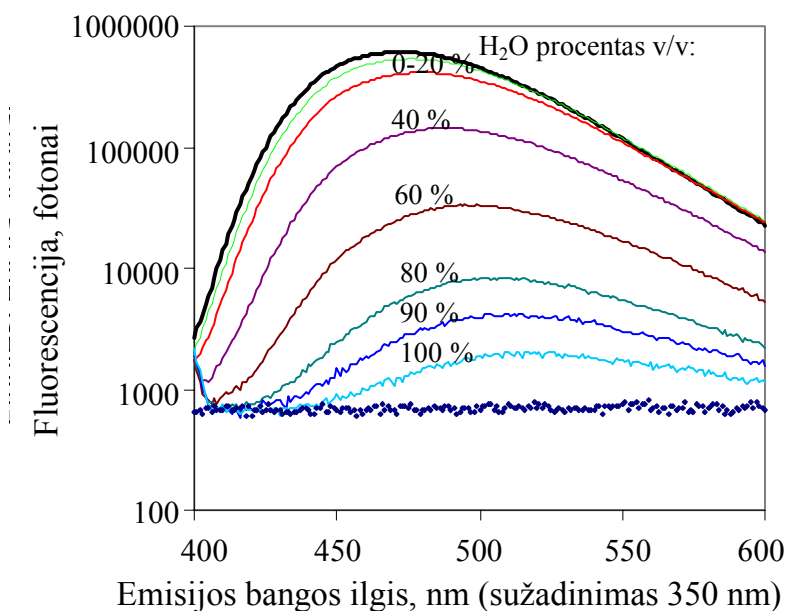
2.15 pav. Pamojinės rūgšties fluorescencijos spektrai, kai koncentracija 10 μM , o sužadinama tam tikrų bangos ilgių šviesa

2.3.5. ANS fluorescencija įvairiuose vandens-DMSO mišiniuose

2.16 ir 2.17 pav. parodyta ANS fluorescencijos priklausomybė nuo vandens procento DMSO tirpale. Pirmajame pav. parodyta fluorescencija tiesinėje, o antrajame – logaritminėje skalėje. Juo didesnis vandens procentas, juo labiau ANS fluorescencija yra užgesinta. Gryname vandenyje emisija yra šimtus kartų mažesnė negu gryname DMSO. Vandenyje emisijos smailė yra pastumta į ilgesnių bangų pusę (raudonasis poslinkis).



2.16 pav. ANS fluorescencijos spektrų priklausomybė nuo vandens procento DMSO tirpale



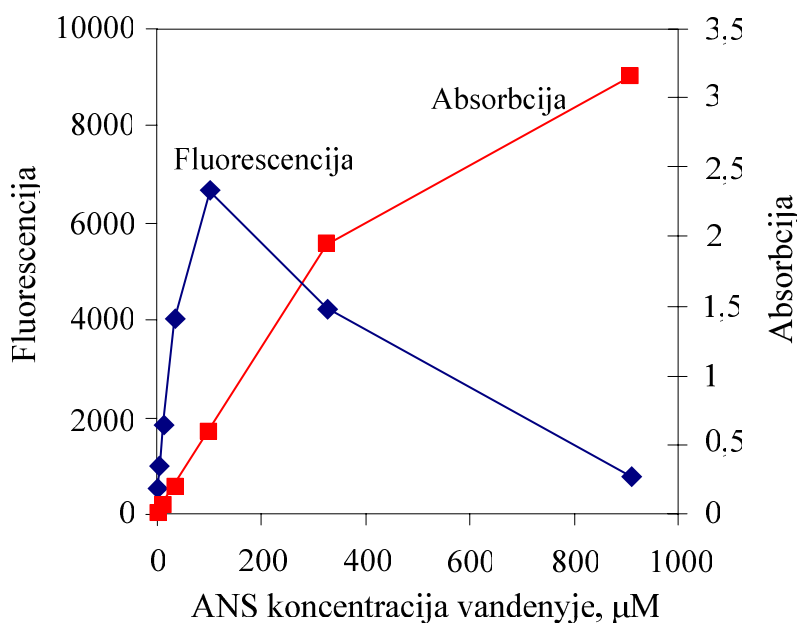
2.17 pav. ANS fluorescencijos spektrų priklausomybė nuo vandens procento DMSO tirpale

Fluorescencija parodyta logaritminėje skalėje, todėl aiškiau matyti, kaip fluorescencija priklauso, kai yra vyraujantis vandens procentas. Įdomu, kad vanduo pradeda žymiau gesinti ANS fluorescenciją, kai jo jau yra net 20–40 proc. Maža vandens priemaiša neturi jokios įtakos fluorescencijai. Tai svarbu prisiminti, kai įsivaizduojame biologines sistemas, kuriose vandens koncentracija siekia apie 70 proc.

2.3.6. Vidinio filtro reiškinys

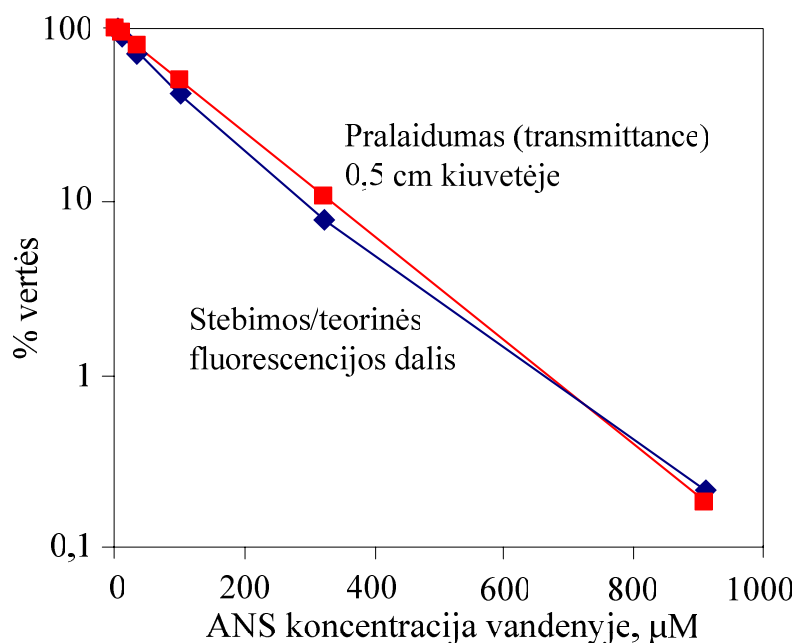
Kai fluoroforo koncentracija kiuvetėje yra didelė, stebime keistą reiškinį – fluorescencija ima mažėti didinant fluoroforo koncentraciją. Šis reiškinys vadinamas vidinio filtro reiškinium (*inner filter effect*). 2.18 pav. parodytas ANS fluorescencijos mažėjimas, kai koncentracija pasiekia apie 100 μM .

Palyginti pateikta absorbcija ties 350 nm, t.y. tokio bangos ilgio, kur sužadinamas ANS, kad šis fluorescuotų. Matome, kad šviesos sugertis yra gana didelė šioje koncentracijų srityje.



2.18 pav. Vidinio filtro reiškinys, kai ANS fluorescencija ima mažėti esant gana didelėms koncentracijoms. Duomenys autoriaus

Iš absorbcijos verčių apskaičiuojame kiuvetės pralaidumą. Juo didesnė ANS koncentracija, juo mažesnis šviesos pralaidumas. Kai koncentracija yra apie 300 μM, pralaidumas siekia apie 10 proc. Šis pralaidumas apskaičiuotas, darant prielaidą, kad šviesai tenka keliauti iki fluoroforo 0,5 cm, t.y. pusę kelio per kiuvetę. Tai yra vidutinis kelias, kurį šviesa keliauja per kiuvetę. Tada fluorescencija keliauja visomis kryptimis, vidutiniškai taip pat 0,5 cm, kol pasiekia detektorį. Palyginti 2.19 pav. pateikta praktiškai matoma fluorescencijos dalis nuo teoriškai įmanomos fluorescencijos, jeigu fluorescencija būtų linijiškai didėjusi ankstesniu grafiku, o nebūtų pradėjusi mažėti.



2.19 pav. Vidinio filtro reiškinio paaiškinimas sužadinančios šviesos absorbcija

Trumpai apžvelgėme fluorescencijos teorinius ir tam tikrus praktinius aspektus. Tai labai įdomi sritis, kuri dažnai naudojama daugeliui biologijos sričių, kurios čia nebuvo paminėtos. Jei norime išsamiau sužinoti apie fluorescencijos reiškinių, rekomenduoju vadovėlį [5].

3. Magnetinio branduolių rezonanso metodai

3.1. Įvadas

1946 m. dvi tyrinėtojų grupės, atskirai viena nuo kitos, pirmą kartą stebėjo magnetinio branduolių rezonanso signalus. 1952 m. už šį atradimą Felix Bloch ir Edward Purcell buvo apdovanoti Nobelio premija. Per pusę amžiaus šis metodas, vėliau pavadintas magnetiniu branduolių rezonansu (MBR, *nuclear magnetic resonance*, NMR), tapo vienu pagrindinių organinės chemijos ir biochemijos fizikinių tyrimų metodų. Prieš keletą metų šveicarų tyrinėtojas Kurt Wüthrich gavo Nobelio premiją už MBR metodų plėtojimą ir panaudojimą tiriant atominės skiriamosios gebos baltymų struktūras ir makromolekulių dinamiką. Jau 2002 m. iš 19 000 makromolekulių baltymų struktūrų, esančių duomenų bazėje (www.pdb.org), 3000 jau buvo nustatytos MBR metodais. Vienas didžiausių MBR privalumų, palygti su rentgenostruktūrine kristalografija, yra tai, kad nereikia baltymo kristalinti, todėl tyrimo metu gauta struktūra parodo baltymo dinaminę būseną vandeniniame tirpale. Tačiau MBR metodais galima nustatyti tik gana nedidelės molekulinės masės baltymų (iki apie 30 kDa) struktūras, bet ši riba vis kyla.

3.2. MBR principai

3.2.1. Branduolio kampinis momentas ir magnetinis momentas

Daugelio cheminių elementų branduoliai turi jiems būdingą branduolio kampinį momentą P (*nuclear angular momentum*). Remiantis kvantinės mechanikos teorija, kaip ir daug kitų atomo savybių, šis kampinis momentas yra kvantuotas:

$$P = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)}. \quad (1)$$

Čia h yra Planko konstanta ($h = 6.6256 \times 10^{-34}$ J s), o I yra kampinio momento kvantinis skaičius, paprastai vadinamas sukinio kvantiniu skaičiumi, branduolio sukiniu (*nuclear spin*). Šio sukinio vertės gali būti $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots$ iki 6. Iki šiol teorija negali numatyti nei magnetinio kampinio momento, nei sukinio verčių. Branduolio kampinis momentas P yra tiesiogiai proporcingas magnetiniam momentui μ (*magnetic moment*). Abu yra vektoriai. Jų proporcingumo koeficientas yra gyromagnetinis santykis γ (*gyromagnetic ratio, magnetogyric ratio*), būdingas kiekvienam atomo branduoliui:

$$\mu = \gamma P. \quad (2)$$

Juo didesnis γ , juo jautresnis yra šio atomo branduolio MBR eksperimentas. Daugelio atomų branduolio kampinis momentas ir magnetinis momentas yra nukreipti į tą pačią pusę, tačiau tam tikrais atvejais, pvz., elektrono, ^{15}N ir ^{29}Si , šie vektoriai veikia priešingomis kryptimis. Svarbiausių biochemijos nagrinėjamų atomų branduolių, pvz., ^{12}C ir ^{16}O , sukiniai yra lygūs nuliui, todėl jų negalima stebėti

MBR metodais. Tenka tyrinėti ^{13}C ir ^{17}O branduolius, kurie sudaro apie vieną procentą ar mažiau tų elementų natūraliai aptinkamų branduolių. Tada yra būtina naudoti labai koncentruotus tirpalus, arba pavyzdžius, dirbtinai padidinus reikiamu izotopo kiekiu. 3.1 lentelėje yra surašyti pagrindiniai nuklidai, naudojami biocheminiams MBR eksperimentams.

3.1 lentelė. Nuklidų, dažniausiai naudojamų MBR eksperimentams, savybės

Nuklidas	Sukinys, I	Elektrinis kvadrupolio momentas 10^{-28} m^2	Natūralus nuklido aptinkamumas, proc.	Santykinis jautrumas ($^1\text{H}=1$)	Gyromagnetinis santykis γ $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$	MBR dažnis MHz ^a
^1H	$\frac{1}{2}$	-	99,985	1	26,7519	100,00
^2H	1	$2,87 \times 10^{-3}$	0,015	$9,65 \times 10^{-3}$	4,0166	15,351
$^3\text{H}^b$	$\frac{1}{2}$	-	0	1,21	28,5350	106,664
^{12}C	0	-	98,9	-	-	-
^{13}C	$\frac{1}{2}$	-	1,108	$1,59 \times 10^{-2}$	6,7283	25,144
^{14}N	1	$1,67 \times 10^{-2}$	99,63	$1,01 \times 10^{-3}$	1,9338	7,224
^{15}N	$\frac{1}{2}$	-	0,37	$1,04 \times 10^{-3}$	-2,7126	10,133
^{16}O	0	-	99,96	-	-	-
^{17}O	$\frac{5}{2}$	$-2,6 \times 10^{-2}$	0,037	$2,91 \times 10^{-2}$	-3,6280	13,557
^{19}F	$\frac{1}{2}$	-	100	0.83	25,1815	94,077
^{23}Na	$\frac{3}{2}$	0,1	100	9.25×10^{-2}	7,0704	26,451
^{29}Si	$\frac{1}{2}$	-	4,70	$7,84 \times 10^{-3}$	-5,3190	19,865
^{31}P	$\frac{1}{2}$	-	100	$6,63 \times 10^{-2}$	10,8394	40,481

a – kai $B_0 = 2.3488 \text{ T}$,

b – radioaktyvusis.

3.2.2. Branduoliai statiniame magnetiniame lauke

Jei branduolys su kampiniu momentu P ir magnetiniu momentu μ yra dedamas į statinį magnetinį lauką, kurio srautas B_0 , tai kampinio momento projekcija į magnetinio lauko kryptį P_z yra proporcinga Planko konstantai:

$$P_z = m \frac{h}{2\pi} = m\hbar. \quad (3)$$

Čia m yra magnetinis, arba kryptinis kvantinis skaičius (*magnetic or directional quantum number*) $m = I, I-1, \dots, -I$. Magnetinių kvantinių skaičių derinių gali būti $(2I+1)$. Taigi vandenilio (^1H) ir anglies (^{13}C) branduoliams, kurių sukinys yra $I=1/2$, tenka dvi m vertės ($+1/2$ ir $-1/2$), o branduoliams, kurių $I = 1$ (^2H , ^{14}N), tenka trys m vertės ($m = +1, 0, -1$).

Magnetinio momento komponentai, atsižvelgiant į lauko kryptį z , yra:

$$\mu_z = m\gamma\hbar. \quad (4)$$

Magnetiniame lauke branduolinis dipolis sukasi aplink z ašį Larmor dažniu ν_L , kuris yra proporcingas magnetiniam laukui B_0 :

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0. \quad (5)$$

Dėl kryptinio kvantavimo magnetiniame lauke besisukantis branduolinis dipolis yra nukrypęs nuo z ašies griežtai apibrėžtu kampu. Pavyzdžiui, protono (vandenilio atomo branduolio), kurio branduolio sukinys yra $1/2$, šis kampas yra $54^\circ 44'$.

Magnetinio dipolio energija (E) magnetiniame lauke yra:

$$E = -\mu_z B_0, \quad (6)$$

todėl ir energijos lygių vertės (branduoliniai Zemano lygmenys) yra:

$$E = -m\gamma\hbar B_0. \quad (7)$$

Protonas ir ^{13}C branduoliai turi du energijos lygius, deuterio ir ^{14}N branduoliai – tris. Visais atvejais energijos skirtumas tarp gretimų energijos lygių yra:

$$\Delta E = \gamma\hbar B_0. \quad (8)$$

Kaip matome, šis energijos skirtumas yra proporcingas magnetinio lauko stiprumui. Iš čia seka, kad norint MBR eksperimentų metu kuo toliau atskirti spektro smailes viena nuo kitos, t.y. padidinti eksperimento skiriamąją gebą, reikia naudoti kuo stipresnius magnetus.

3.2.3. Rezonanso sąlyga

Išorinio lauko elektromagnetinių bangų magnetinis komponentas sąveikauja su branduolio dipoliais. Norint, kad branduolys pereitų iš žemesnio į aukštesnį energijos lygmenį, energija turi būti absorbuota, o iš aukštesnio į žemesnį – emituota. Abu peršokimai (tranzicijos) yra galimi ir jų tikimybė vienoda. Magnetinio branduolių rezonanso eksperimento metu peršokimai tarp skirtingų energijos lygmenų yra sukelti veikiant (iradijuojant) branduolius elektromagnetinėmis bangomis, kurių dažnis ν_1 atitinka rezonanso sąlygą.

Norėdami praktiškai įsivaizduoti branduolių pasiskirstymą energijos lygmenyse, panagrinėkime pavyzdį. Kai magnetinio lauko stiprumas $B_0 = 1.41 \text{ T}$ (Teslos), tada protonui rezonanso dažnis yra lygus 60 MHz. Branduolių skaičius viršutiniame energijos lygmenyje N_β ir apatiniame lygmenyje N_α yra pasiskirstę remiantis Bolcmano pasiskirstymo dėsniu:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} = e^{-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}. \quad (9)$$

Čia k_B yra Bolcmano konstanta ($k_B = 1.3805 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) ir T yra absoliuti temperatūra kelvinais. Esant kambario temperatūrai ($T = 298.15 \text{ K}$):

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = 0.9999903. \quad (10)$$

Matome, kad viršutinio energijos lygmens populiacija yra tik apie dešimčia milijonųjų dalių mažesnė už apatinę. Jeigu padidinsime magnetinio lauko stiprumą B_0 iki 14,1 T (rezonansas ties 600 MHz), tada šis santykis sumažės iki 0,9999033.

Kiekvieno peršokimo metu keičiasi sukinio orientacija. Žemesniame lygmenyje yra nežymus populiacijos perteklius, energijos absorbcija iš išorinio elektromagnetinio lauko yra vyraujantis procesas. Tai sukelia signalą, kurio intensyvumas yra proporcingas populiacijų skirtumui $N_\alpha - N_\beta$. Šis signalas taip pat proporcingas absoliučiam sukinų skaičiui mėginyje (koncentracijai). Kartais populiacijos yra specialiai vienodinamos ($N_\alpha = N_\beta$). Tada absorbcijos ir emisijos procesų signalai vienas kitą panaikina. Tokia situacija vadinama prisotinimu (*saturation*).

Magnetinio branduolių rezonanso eksperimento metu peršokimai tarp skirtingų energijos lygių yra sukeliama veikiant branduolius elektromagnetinėmis bangomis, kurių dažnis ν_1 atitinka rezonanso sąlygą. Taigi rezonansas pasiekiamas, kai nuklido Larmor dažnis sutampa su išorinio lauko elektromagnetinių bangų dažniu:

$$\nu_L = \nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0. \quad (11)$$

Branduoliuose, kurių $I \geq 1$, yra daugiau negu du energijos lygmenys. Tačiau, remiantis kvantinės mechanikos teorija, leistini yra tik tie peršokimai, kurių metu magnetinis kvantinis skaičius m pakinta per vienetą.

3.2.4. Branduolio ekranavimas, cheminis poslinkis

Molekulėse atomų branduoliai yra šiek tiek dengiami elektronais ir kitais branduoliais. Todėl diamagnetinėse molekulėse magnetinis laukas B_{eff} prie branduolio yra visada mažesnis negu išorinis laukas B_0 . Kitaip tariant, branduoliai yra iš dalies ekranuojami. Matematiškai tai išreiškiama:

$$B_{eff} = B_0 - \sigma B_0 = (1 - \sigma) B_0. \quad (12)$$

čia σ yra ekranavimo konstanta (*shielding constant*), bėmatis 10^{-5} eilės protonų dydis, bet gerokai didesnis sunkių branduolių, kurie yra labiau ekranuojami. Ekranavimo konstanta priklauso nuo molekulės struktūros, bet nepriklauso nuo išorinio magnetinio lauko stiprumo (stiprio). Kaip matysime iš pavyzdžių, šios ekranavimo konstantos žinojimas padeda tiksliai nustatyti cheminę struktūrą, net jei molekulės labai didelės ir sudėtingos.

Atsižvelgiant į ekranavimą, rezonanso sąlyga yra:

$$\nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0. \quad (13)$$

Kai magnetinio lauko stipris B_0 yra 2,11 T, protono rezonansinis dažnis yra 90 MHz. Esant šiam magnetinio lauko stipriui, tetrametilsilanas (TMS) rezonuoja ties 90 000 000 Hz = 90 MHz, metilo bromidas rezonuoja ties 90 000 237 Hz, dibromometanas ties 90 000 441 Hz, o tribromometanas – ties 90 000 614 Hz. Taigi šių junginių vandenilių branduoliai yra labiausiai ekranuojami TMS, o mažiausiai – tribromometane. Remiantis susitarimu, rezonanso signalai spektre yra užrašomi tokia kryptimi, kad ekranavimo konstanta didėtų iš kairės į dešinę. Šia kryptimi magnetinio lauko stipris didėja (jei ν_1

yra pastovus) tai yra sakoma, kad labiausiai ekranuojantis junginys yra aukštesniame lauke (*upfield*), o mažiau ekranuojantis – žemesniame lauke (*downfield*).

MBR spektroskopijoje nėra absoliučios spektrinės skalės, nes to paties junginio rezonanso magnetinio lauko stipris ir elektromagnetinių bangų dažnis yra tarpusavyje susiję ir gali būti įvairūs. Dėl šios priežasties yra naudojama santykinė skalė, kurioje surašomos ne absoliučios, bet santykinės rezonanso vertės, skaičiuojamos nuo pasirinkto standarto vertės. ^1H ir ^{13}C MBR spektroskopijai dažniausiai naudojamas tetrametilsilanas (TMS), kuris vadinamas vidiniu etalonu. Šis junginys turi keletą svarbių privalumų: a) TMS turi dvylika identiškų stipriai ekranuotų protonų, todėl spektre matyti tik viena, bet labai ryški linija ir beveik visada ji yra spektro dešinėje; b) reikia nedidelės TMS koncentracijos; c) TMS yra chemiškai inertiškas, magnetiškai izotropiškas; d) TMS virimo temperatūra yra $26,5\text{ }^\circ\text{C}$, todėl jį galima nesunkiai pašalinti iš pavyzdžio. Tačiau TMS tirpumas vandenyje yra ribotas. Kai naudojamas tiriamojo pavyzdžio vandeninis tirpalas, TMS yra užlydomas į atskirą kapiliarą ir įdedamas į tą patį mėgintuvėlį. Tada jis vadinamas išoriniu etalonu. Etalonine medžiaga gali būti ir kiti junginiai, o taip pat tirpikliai: cikloheksanas, benzenas arba vandenyje gerai tirpus 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonatas.

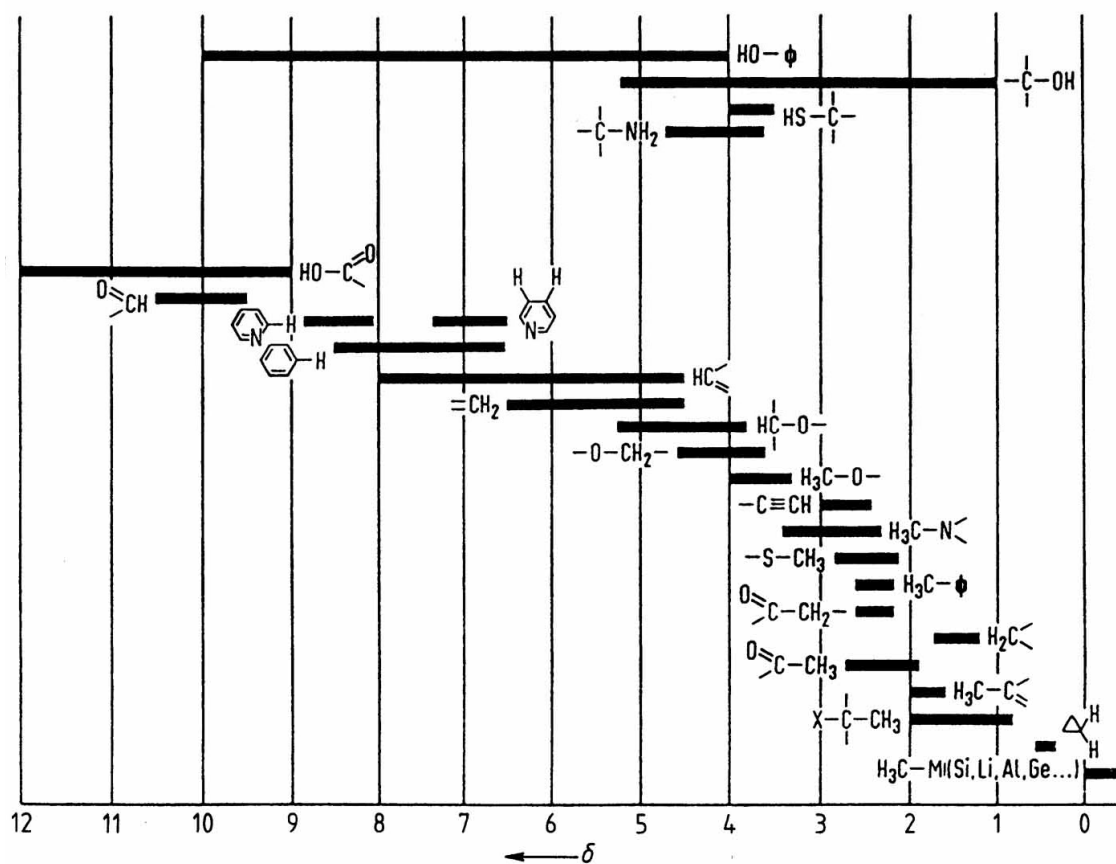
Santykinės skalės nauja įvesta sąvoka – cheminis poslinkis (*chemical shift*) δ , lygus:

$$\delta = \frac{V_{\text{pavyzdys}} - V_{\text{standartas}}}{V_{\text{standartas}}} \times 10^6. \quad (14)$$

Cheminis poslinkis yra bematis dydis, visada išreiškiamas milijoninėmis dalimis (ppm). Kai standartu naudojamas TMS, jo poslinkis $\delta(\text{TMS})$ yra lygus 0. Vertės į kairę nuo TMS signalo yra teigiamos, o į dešinę – neigiamos. Taigi tribromometano protono cheminis poslinkis yra 6,82, o bromometano – 2,63. Šios vertės nepriklauso nuo to, kokio dažnio spektrometras yra naudojamas.

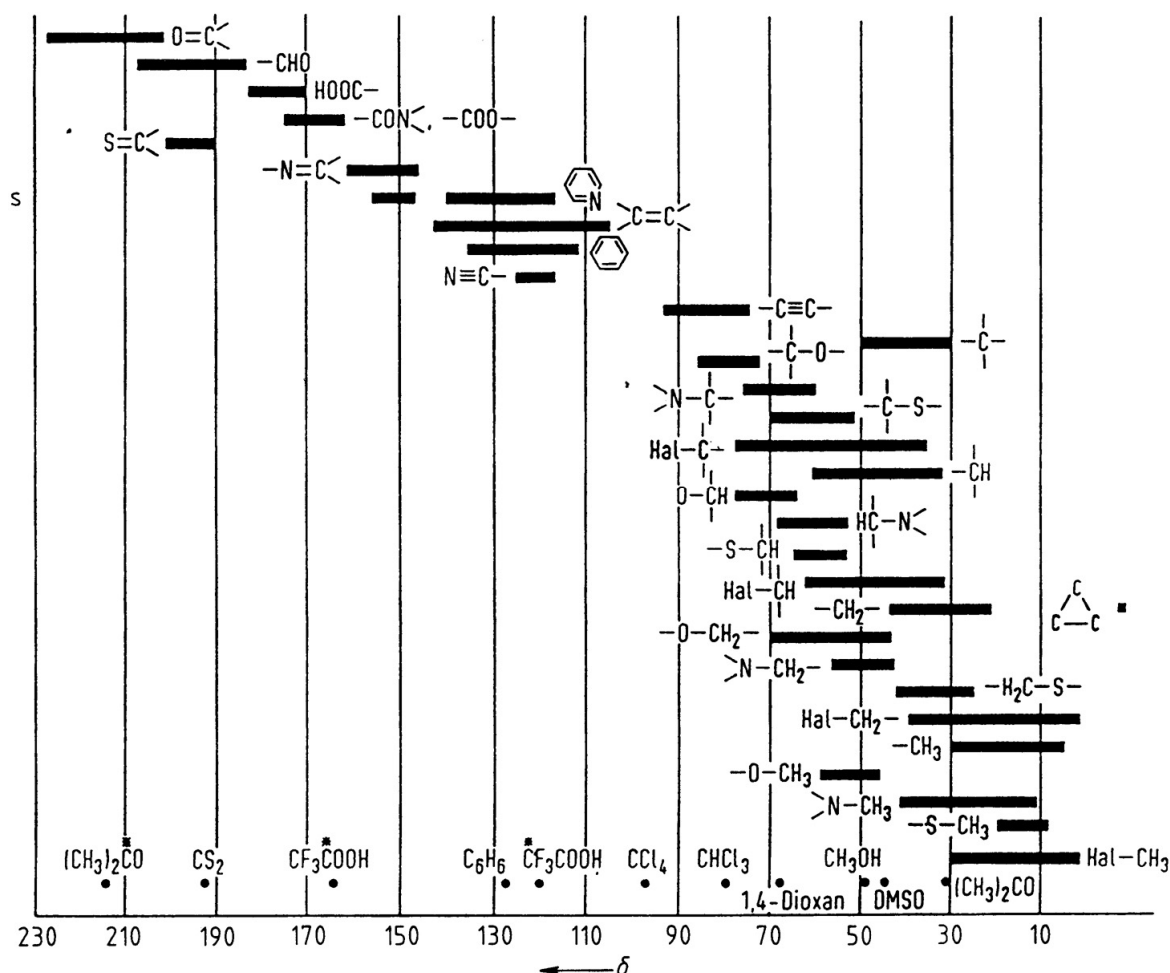
Tipiški protono ir anglies rezonansų dažnių cheminiai poslinkiai yra parodyti 3.1 ir 3.2 pav. Alifatinų sočiųjų angliavandenilių protonai ir anglies branduoliai yra labiau ekranuoti negu aromatinių junginių.

MBR eksperimentų metu tirpikliu yra dažniausiai naudojamas D_2O arba deuterintas dimetilsulfoksidas (DMSO). Vanduo šiam tikslui netinka, nes jo signalas nustelbtų kitus signalus. Netgi vandens priemaiša (tiksliau DHO) dažnai trukdo eksperimentams. Hidroksilo- ir aminogrupių protonai yra labilūs, todėl dažniausiai pakeičiami tirpiklio D_2O deuterio atomais. Dėl to šių grupių protonai sunkiai matyti MBR.



3.1 pav. Organinių junginių protonų cheminiai poslinkiai [6]

Labiausiai ekranuojami yra sočiųjų angliavandenilių metilo grupių protonai (dar labiau yra ekranuojami tetrametiličio ar tetrametilgermanio protonai), o mažiausiai – aldehydų ar karboksirūgščių protonai.



3.2 pav. Organinių junginių anglies cheminiai poslinkiai [6]

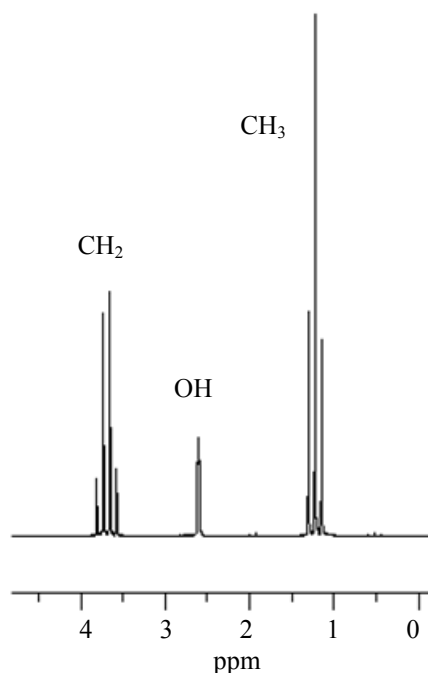
Kaip ir protonai, labiausiai ekranuojami yra sočiųjų angliavandenilių metilgrupeių anglies atomų branduoliai (^{13}C), o mažiausiai – karbonylgrupės anglies (^{13}C) atomo branduoliai.

3.2.5. Sukinių sąveika

Kaimyninių branduolių magnetiniai dipoliai sąveikauja vienas su kitu. Ši sukinio-sukinio sąveika (*spin-spin coupling*) šiek tiek pakeičia rezonansinį dažnį. Netiesioginė sukinio-sukinio sąveika pasireiškia per cheminius ryšius, o tiesioginė – per erdvę. Tirpaluose sąveika per erdvę išnyksta, nes susivienodina dėl molekulių judėjimo. Todėl tiesioginė sukinio-sukinio sąveika svarbi tik kietojo kūno MBR spektroskopijai, kurios čia nenagrinėsime.

Panagrinėkime situaciją, kai cheminys junginys turi du chemiškai neekvivalentiškus protonus. Šiuos protonus pažymėkime A ir B. Vieno jų signalas yra ties x ppm, o kito – ties y ppm. Kiekvieno branduolio magnetinio momento z komponentė μ_z gali būti teigiama arba neigiama, jas žymime rodyklėmis $\uparrow$ ir $\downarrow$. Abiejų sukinų populiacijos beveik lygios. Jeigu branduolių A ir B sukiniai sąveikauja, tai B ($\uparrow$) branduolys sukurs šiek tiek skirtingą lauką negu B($\downarrow$) branduolys. Tada branduolio A spektre vietoj vienos smailės atsiras dvi smailės, kurių viena bus pasislinkusi šiek tiek kairėn, o kita – dešinėn. Vietoje vienos smailės (*singletas*) bus dvi smailės (*dupletas*). Lygiai taip pat ir branduolys A paveiks branduolio B rezonansų dažnį, paversdamas B signalą dupletu. Intervalas tarp abiejų smailių duplete

yra lygus netiesioginės sąveikos konstantai J_{AB} . Šis intervalas priklauso tik nuo branduolių magnetinių momentų, ryšių skaičiaus, ilgio, hibridizacijos tipo, pakaitų elektrinio neigiamumo ir nepriklauso nuo magnetinio lauko stiprio. Todėl J_{AB} visada matuojama Hz ir kinta nuo 1 iki 20.



3.3 pav. Etanolio protonų (^1H) MBR spektras [6]

3.3 pav. yra pavaizduotas etanolio protonų spektras. Metilo grupės trijų ekvivalentiškų protonų (A) signalas ties 1,2 ppm yra pasidalijęs į tris smailes, o metileno grupės (CH_2) dviejų ekvivalentiškų protonų (B) signalas yra pasidalijęs į keturias smailes. Taip įvyksta dėl protonų sukinių sąveikos derinių. Metileno grupės $\text{B}(\uparrow)$ protonas, sąveikaudamas su $\text{A}(\uparrow)$ protonu, pastumia rezonanso smailę į kairę per J_{AB} . Tuo tarpu sąveika tarp $\text{B}(\uparrow)$ ir $\text{A}(\downarrow)$, arba $\text{B}(\downarrow)$ ir $\text{A}(\uparrow)$ nepastumia rezonanso smailių. Kai $\text{B}(\downarrow)$ protonas sąveikauja su $\text{A}(\uparrow)$ protonu, tada rezonanso smailė pasislenka per J_{AB} į dešinę. Taip vietoj vienos smailės metilo grupės protonai etanolyje sudaro tripletą, kurio vidurinė smailė apytiksliai dvigubai aukštesnė negu šoninės smailės. Tiksliau apibūdžiant, tai yra smailės, kurių plotai proporcingi atitinkamo tipo protonų koncentracijoms. Integruojant smailių plotus, galima nustatyti kiekvieno rezonuojančio atomo santykinę koncentraciją.

Panašiai ir trys metilo grupės protonai paveikia du metileno grupės protonus. Tačiau sąveikų derinių gali būti daugiau ir signalas pasidalija į keturias smailes, kurių centrinės dvi smailės yra trigubai didesnės negu šoninės dvi smailės.

Smailių skaičius multiplete (M) yra lygus:

$$M = 2nI + 1. \quad (15)$$

Čia n yra ekvivalentiškų sąveikaujančių branduolių skaičius, o I – sukinių skaičius.

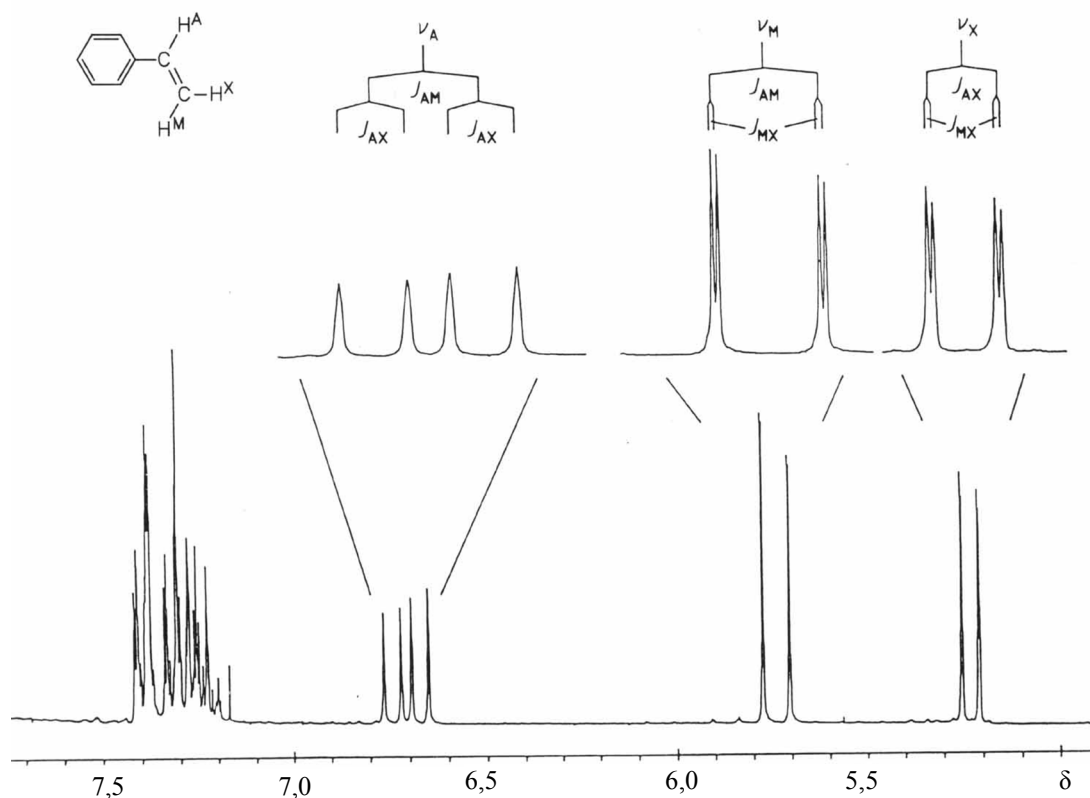
Smailių skaičiui ir jų intensyvumui nustatyti patogiau naudoti Paskalio trikampių:

$$n = 0 \quad 1$$

$$\begin{array}{cccc}
 n = 1 & & 1 & 1 \\
 n = 2 & & 1 & 2 & 1 \\
 n = 3 & & 1 & 3 & 3 & 1 \\
 n = 4 & & 1 & 4 & 6 & 4 & 1 \\
 & & \dots & & \dots & &
 \end{array}$$

Mūsų pavyzdyje (etanolyje) trys metilo grupės protonai A išskirsto metileno grupės protonų B liniją į keturias smailes, kurių intensyvumai lygūs 1:3:3:1.

Sukinių sąveika gali sudaryti ir gerokai sudėtingesnius spektrus, jeigu keletas neekvivalentiškų protonų veikia vieną protoną. Pavyzdžiui, fenileteno spektre yra trys protonai, kurių sukiniai tarpusavyje sąveikauja skirtingai ir turi skirtingas sąveikos konstantas (3.4 pav.).



3.4 pav. Fenileteno protonų MBR spektras [6]

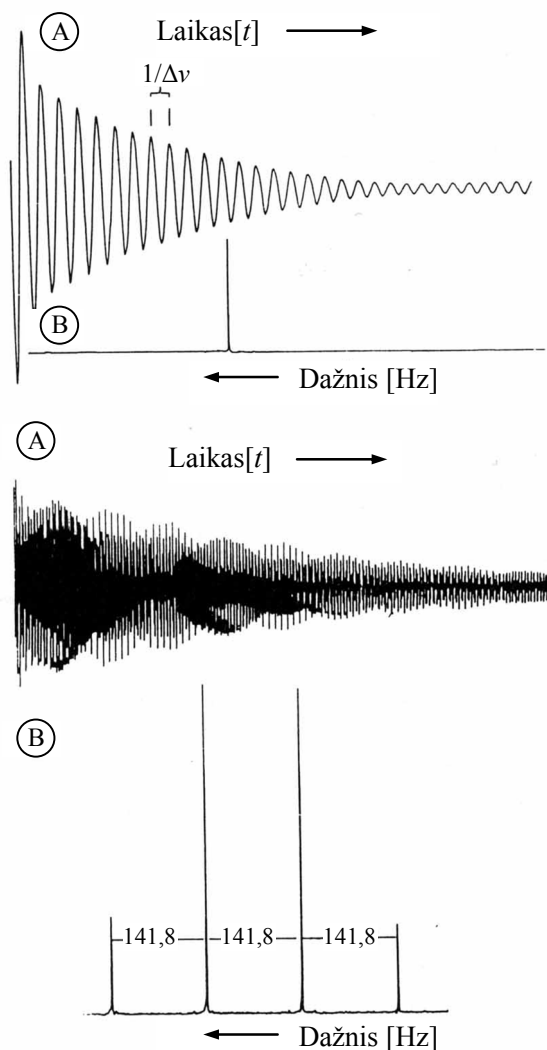
Sąveikos konstantos (J_{AB}) tarp trijų skirtingų aromatiniam žiedui nepriklausančių protonų yra parodytos ties kiekviena smaile. Didžiausia sąveika yra tarp A ir M protonų, o mažiausia – tarp M ir X protonų.

Įdomu, kad sąveikos tarp *ekvivalentinių* branduolių negali būti normaliame MBR spektre. Todėl ir metilbromide, ir benzene visi protonai rezonuoja to pačio dažnio ir jų sąveikų negalima matyti. Dėl to šių junginių spektrai yra gerokai lengviau interpretuojami.

Sąveika galima ir tarp skirtingų branduolių. Pavyzdžiui, trichlormetane greta pagrindinės smailės ties 7,2 ppm yra dvi mažos palydovinės smailės. Jos atsiranda dėl ^{13}C branduolių, kurių apie 1 proc.

yra šiame junginyje. Sąveikos konstanta yra gana didelė $^1J_{\text{CH}} = 209 \text{ Hz}$. Tačiau praktiškai šių sąveikų sukelti signalai dingsta eksperimento triukšme.

Įjungus radijo dažnio elektromagnetines bangas, įvyksta rezonansas, o jas išjungus, įmagnetinimo vektorius relaksuoja, vyksta vadinamasis laisvas indukcijos gesimas (*free induction decay*, FID). 3.5 pav. (viršutinėje dalyje) parodyta laisvo indukcijos gesimo kreivė esant vienam fiksuotam dažniui, o apatinėje – esant keturiems dažniams.



3.5 pav. Laisvo indukcijos gesimo kreivės esant vienam fiksuotam dažniui (viršuje) arba keturiems dažniams (apačioje) (A kreivės). Po kreivėmis parodyti dažnio spektrai (B) [6]

Yra įprasta nagrinėti ne interferogramines kreives, kurios yra laiko funkcija, bet spektrus, kurie yra dažnio funkcija. Matematiškai ši transformacija iš laiko funkcijos į dažnio funkciją yra vadinama Furjė transformacija (*Fourier transformation*) (FT):

$$g(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt. \quad (16)$$

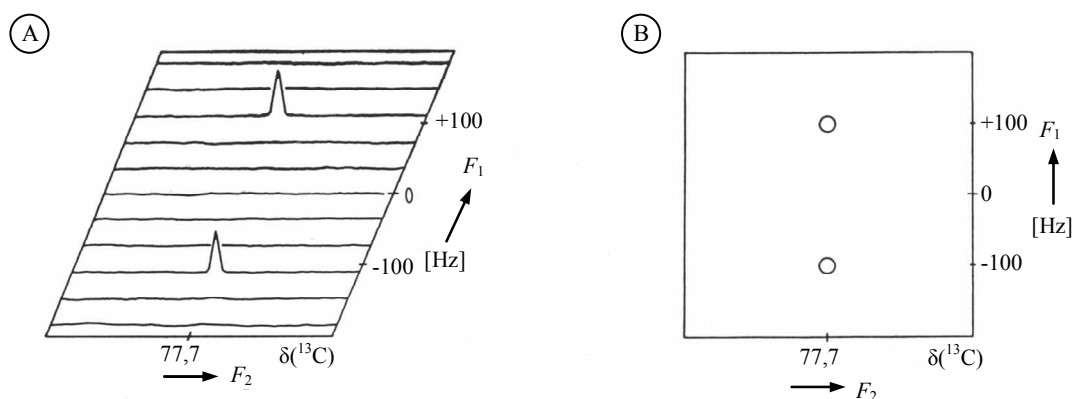
Čia $f(t)$ yra spektro informacija kaip laiko funkcija, o $g(\omega)$ yra kompleksinė dažnio funkcija, sudaryta iš realios ir įsivaizduojamos dalies. Išsamus Furjė transformacijų išvedimas čia nebus nagrinėjamas.

FID kreivė – signalu–triukšmo santykis (signal to noise ratio, S:N) būna labai mažas. Tik tais atvejais, kai branduoliai yra sužadunami pulsais pakankamai daug kartų ir FID kreivės yra sumuojamos, galima gauti pakankamo intensyvumo spektrą. Signalu–triukšmo santykis yra proporcingas pulsų arba sumuojamų signalų skaičiaus kvadratinei šakniai. Laikas, būtinas tokiai FID kreivei užrašyti, yra vadinamas kaupimo laiku (acquisition time). Junginių, kurie yra praskiestame tirpale, arba MBR, kurių jautrumas yra mažas, spektrų užrašymas gali užimti kelias minutes, o dvimačius spektrus, kurie yra aptariami kitame skyriuje, užrašyti prireikia ir visos paros.

3.3. Dvimačiai MBR spektrai

3.3.1. Įvadas

Iki šiol nagrinėti MBR spektrai atrodo esą dvimačiai (signalu intensyvumas kaip dažnio funkcija), tačiau jie vadinami vienmačiais, nes yra nagrinėjama tik viena dažnių ašis. Kai mes kalbame apie dvimačius (2D) MBR spektrus, turime omenyje tuos spektrus, kur abiejose ašyse yra dažniai, o signalu intensyvumui pavaizduoti naudojama trečia erdvinė ašis. 3.6 pav. yra parodytas dvimatis trichlormetano ^{13}C spektras, abscisėje yra įprastinis ppm dažnis, o ordinatėje (F_1) – sąveikos konstantos. Dvimatis spektras, kurį galima išivaizduoti kaip seką vienmačių spektrų, kuriuose yra keičiamas tam tikras papildomas parametras, sudaromas keičiant vieną iš pulsų sekos parametrų. Pulsų sekos yra išsamiai aprašytos specialiojoje literatūroje. 3.6 A pav. dvimatis spektras yra parodytas kaip seka vienmačių spektrų, o 3.6 B pav. tas pats spektras yra parodytas kaip kontūrinis žemėlapis su dviem kryžminėmis smailėmis.



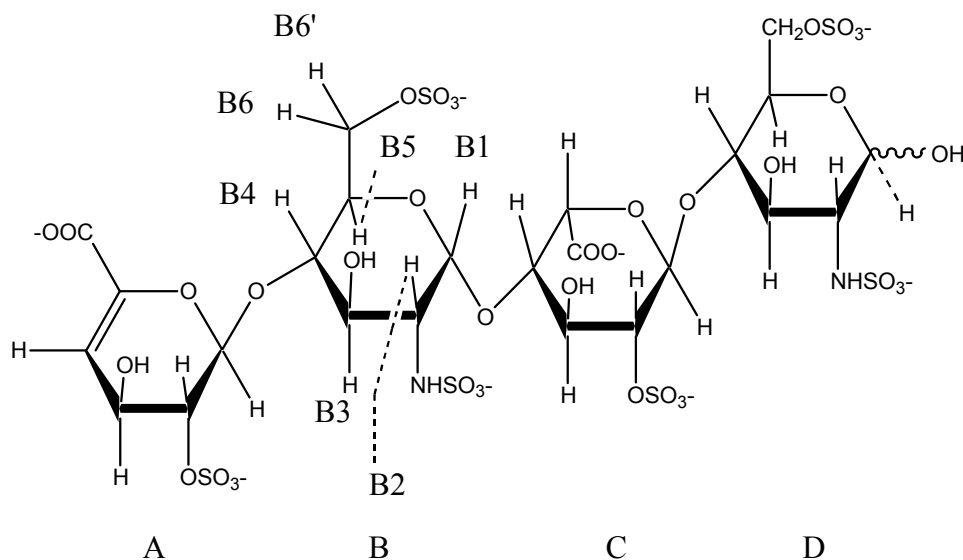
3.6 pav. Dvimatis trichlormetano ^{13}C spektras, kur abscisėje yra rezonanso dažnis, kaip vienmačiuose spektruose, o ordinatėje (F_1) sąveikos konstantos. A) – dvimatis spektras kaip seka vienmačių spektrų, B) – dvimatis spektras kaip kontūrinis žemėlapis [6]

Yra labai daug rūšių dvimačių, trimačių ir aukštesnių matavimų spektrų, tačiau mes detalčiau nagrinėsime tik dvimačius spektrus, kurie yra dažniausiai naudojami biocheminiams tyrimams. Svarbiausios yra šios dvimačių spektrų rūšys: COSY – J-koreliuota spektroskopija (*correlated spectroscopy*), SECSY – sukinio aido koreliuota spektroskopija (*spin echo correlated spectroscopy*), RELAY – *relayed coherence transfer spectroscopy*, DQNMN – *double quantum spectroscopy*, HOHAHA – homobran-

duolinė Hartmano-Hahno spektroskopija (*homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy*), TOCSY – visuotinės koreliacijos spektroskopija (*total correlation spectroscopy*), HETCOR – heterobranduolinė koreliuota spektroskopija (*heteronuclear correlated spectroscopy*), NOESY – branduolinė Overhauzerio reiškinio spektroskopija (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*), ROESY – *rotating frame NOESY*, ir kitos.

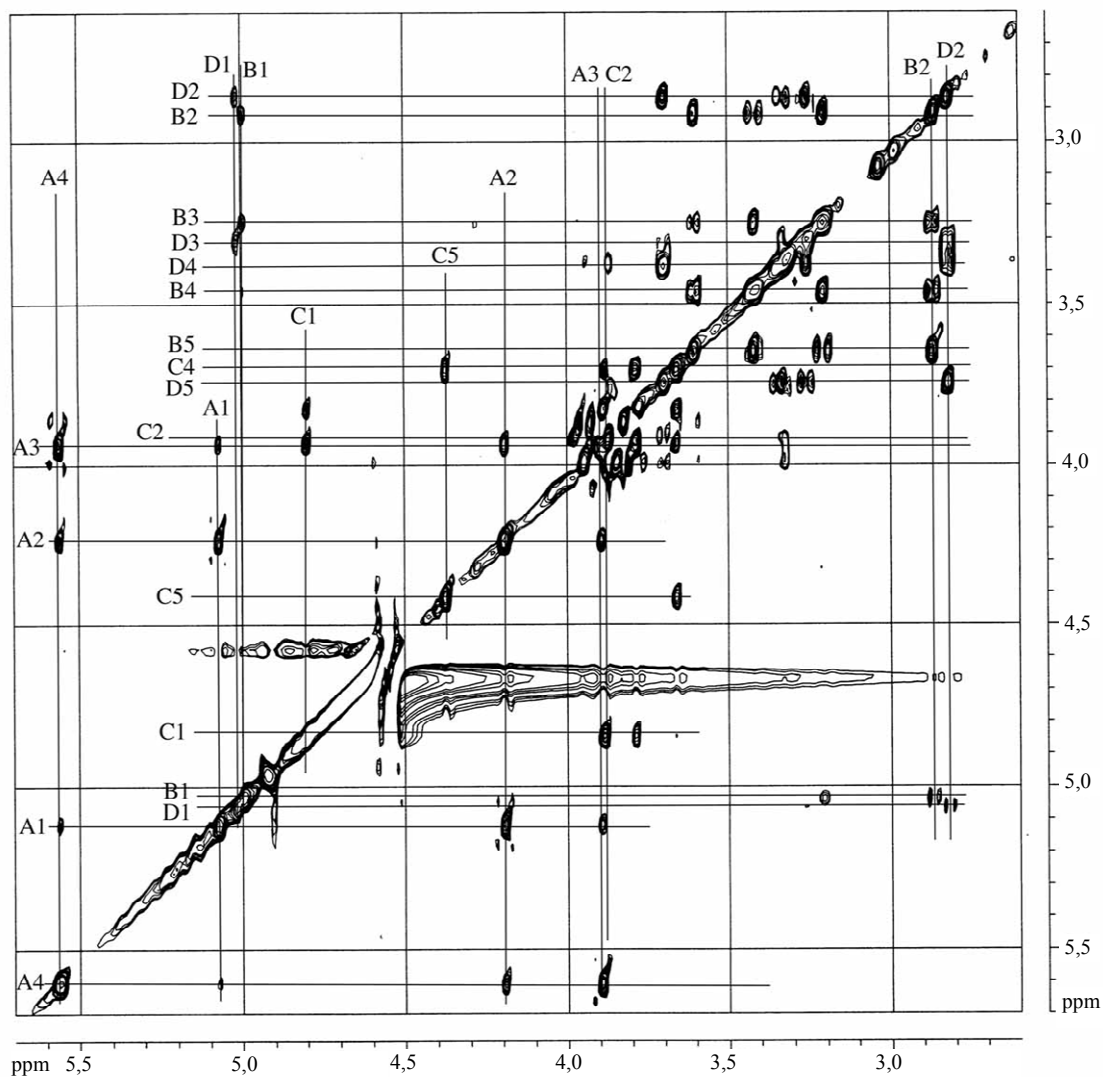
3.3.2. COSY ir TOCSY spektrai

Dabar praktiškai panagrinėsime, kokią informaciją galima gauti iš įvairių dvimačių spektrų. Dvimačio homobranduolinio (kai abu branduoliai vienodi) (H, H)-koreliacinio MBR eksperimento metu yra gaunamas COSY spektras, kuriame protonų cheminiai poslinkiai yra koreliuojami vienas su kitu pagal dvi dažnių ašis. Šio metodo atmaina yra TOCSY, gaunami labai panašūs į COSY spektrai, tik TOCSY spektruose papildomai galima pamatyti koreliacines smailes, kurios parodo kovalentinę sąveiką tarp protonų, toliau nutolusių vienas nuo kito, bet dar priklausančių bendrai sukinių sistemai. Šiuos spektrus lengviau įsivaizduoti nagrinėjant konkrečius pavyzdžius.

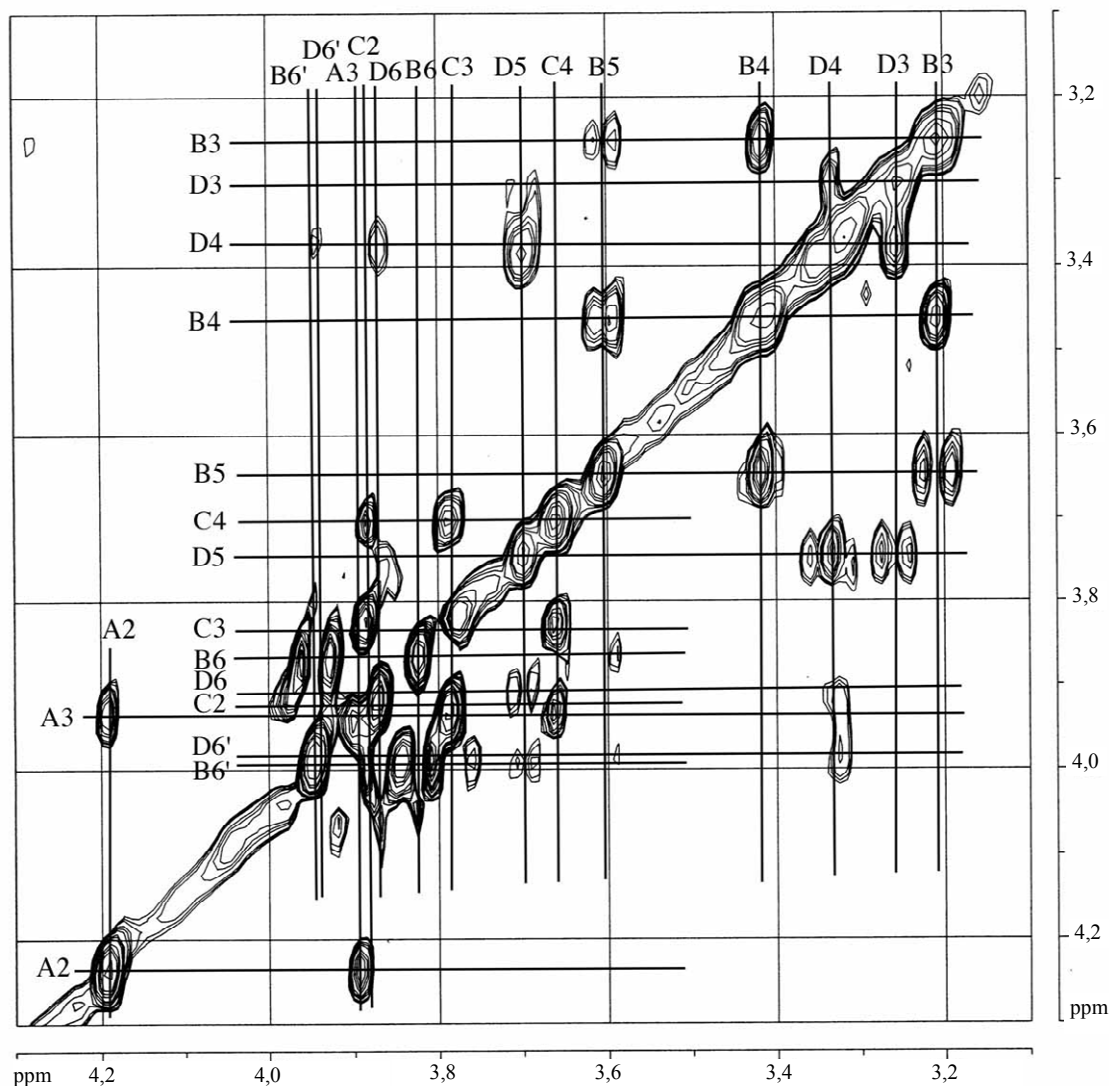


3.7 pav. Heparino molekulė sudaryta iš keturių monosacharidų žiedų. Jos dvimačiai spektrai parodyti 3.8–3.11 pav. Raidėmis nuo A iki D pažymėti monosacharidų žiedai. Paprastumo dėlei tik B žiede pažymėti tie vandenilio atomai (protonai), kurie yra matomi ir nagrinėjami spektruose. Žiede A yra matomi 4 vandenilio branduoliai, žiede C – 5, o žiede D – 7 vandenilio branduoliai. Amino- ir hidroksigrupių vandenilio branduolius (protonus) stebėti yra sudėtinga, nes jie greitai keičiasi su deuterio atomais iš tirpiklio D₂O

3.8 pav. yra pavaizduotas heparino molekulės TOCSY spektras. Abiejose ašyse yra atidėti protonų dažniai, o kryžminės smailelės (*cross-peaks*) rodo koreliacijas tarp protonų. Vertikalios ir horizontalios linijos, pažymėtos raidėmis ir skaičiais nuo A1 iki D6', rodo tuos ppm dažnius, kurie būtų matomi vienmačiuose spektruose. Praktiškai visi vienam monosacharido žiedui priklausantys protonai koreliuoja tarpusavyje. Srityje tarp 3,2 ir 4,0 ppm yra daug smaيليų, išsidėsčiusių viena šalia kitos. Norint jas lengviau atskirti, ta sritis padidinta 3.9 pav.



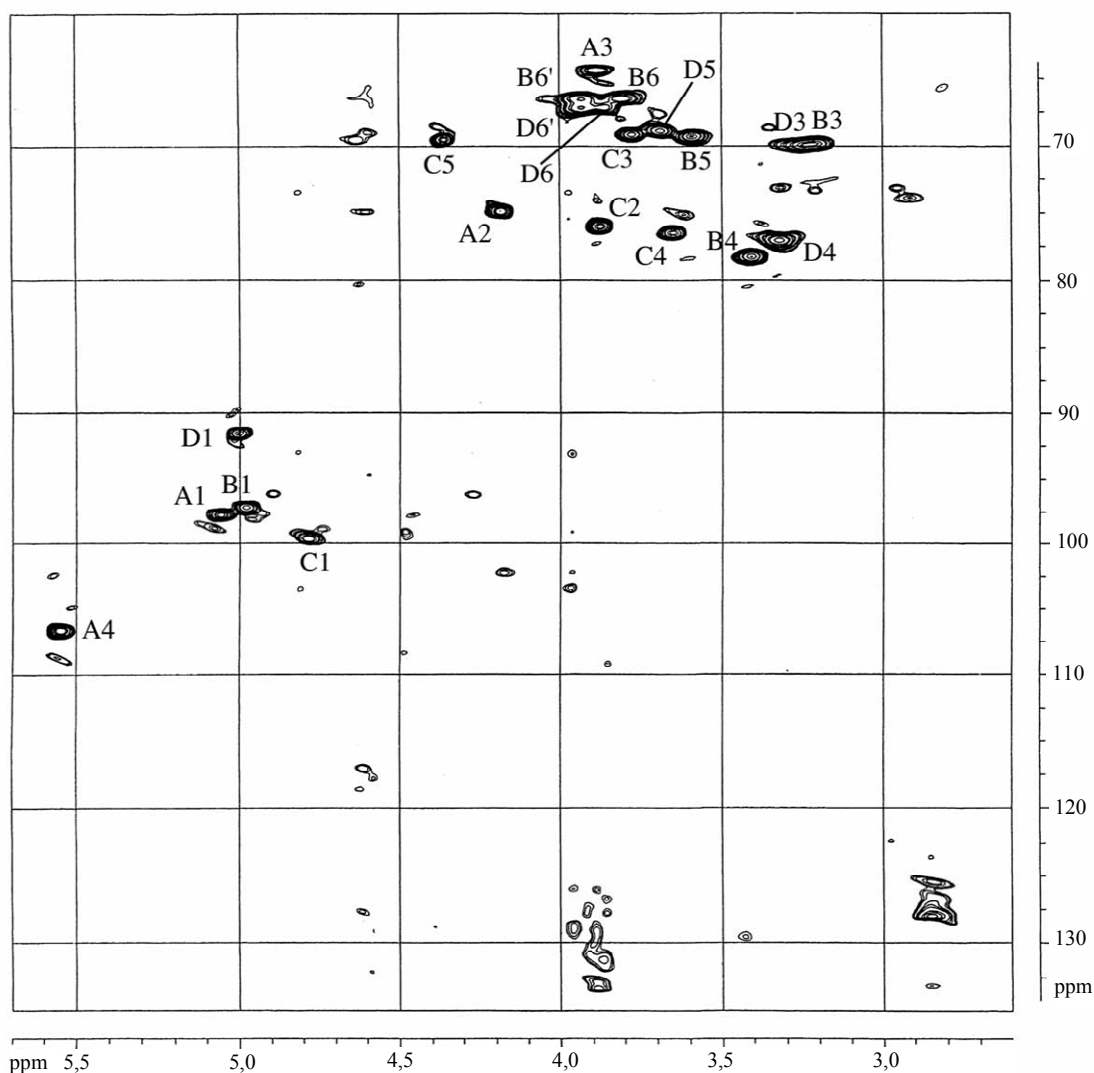
3.8 pav. Heparino molekulės protonų TOCSY spektras. Visų spektre matomų protonų rezonansiniai dažniai yra pažymėti linijomis su raidėmis ir skaičiais, atitinkančiais 3.7 pav. pavaizduotą struktūrą. Linijų susikirtimo vietose yra matomos tai pačiai sukinių sistemai priklausančios koreliacinės smailės. 3.9 pav. yra parodyta didesnė sritis tarp 3,2 ir 4,0 ppm (autorius duomenys)



3.9 pav. Didesnė 3.8 pav. TOCSY spektro sritis tarp 3.2 ir 4.2 ppm (autorius duomenys)

3.3.3. HETCOR spektras

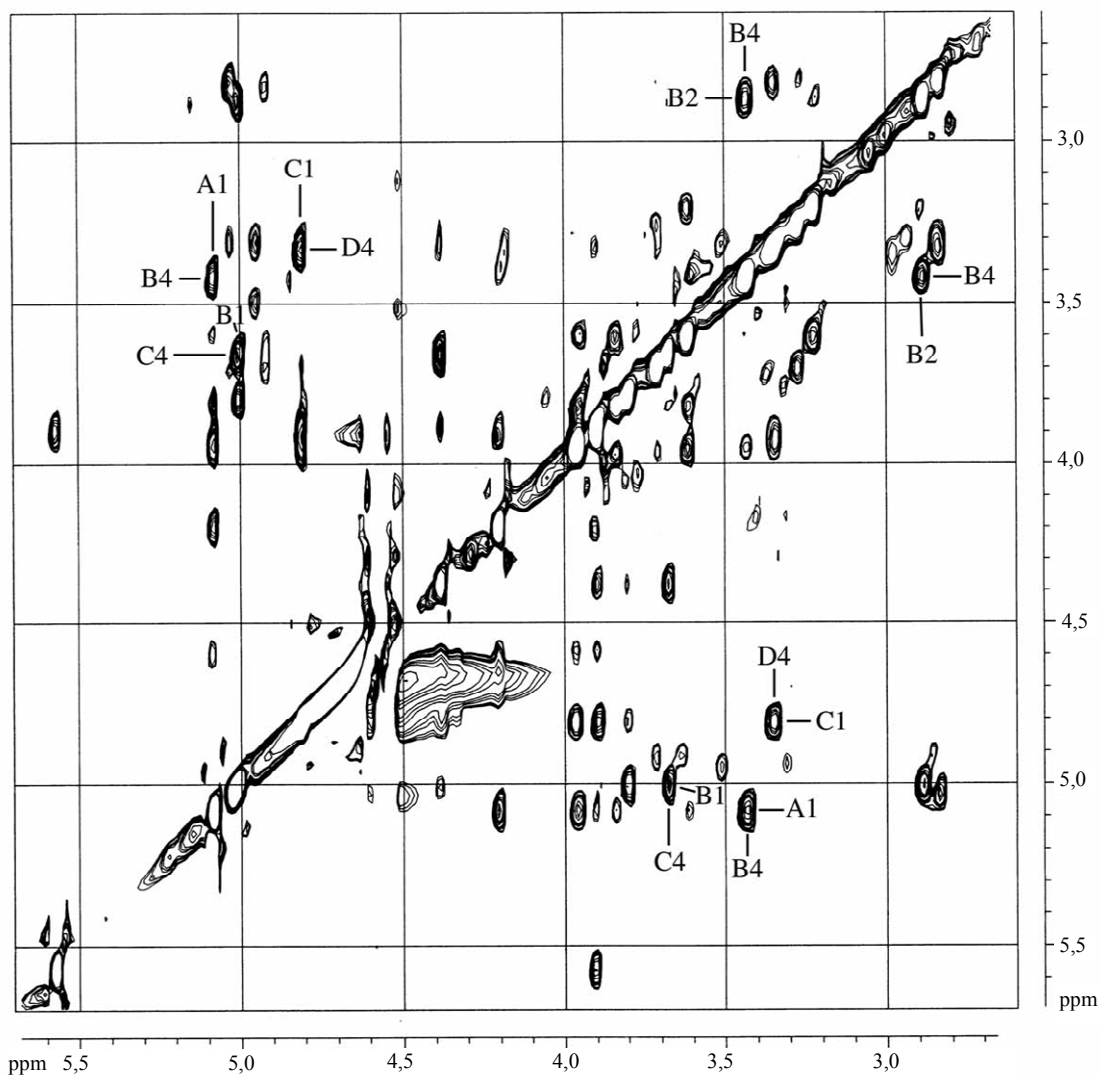
3.10 pav. yra parodytas tos pačios heparino molekulės HETCOR spektras. Matyti koreliacijos tarp ^{13}C anglies branduolių ir protonų. Matomos kiekvieno C-H ryšio koreliacinės smailės. Protonų smailės yra lengviau identifikuoti iš TOCSY spektrų negu iš anglies. Analogiškus anglies TOCSY spektrus būtų galima nustatyti tik pakeitus visus anglies atomus į ^{13}C . Todėl anglies smailės yra identifikuojamos naudojant heterobranduolinę koreliacinę spektroskopiją. Ašyje x yra atidedami protonų dažniai (žinomi iš TOCSY spektro) ir pagal juos yra matuojami atitinkamų anglies atomų dažniai y ašyje. Taip galima nesunkiai nustatyti, kurios anglies branduolių smailės priklauso konkretiems anglies atomams cheminėje struktūroje.



3.10 pav. Heparino molekulės, kurios struktūra parodyta 3.7 pav., HETCOR (^1H - ^{13}C) spektras. Koreliacinės smailės rodo, kurie protonai yra susiję su tam tikrais anglies atomais. Smailių numeracija yra ta pati kaip ir 3.7 pav. Smailės B2 ir D2 yra už spektro ribų (autorius duomenys)

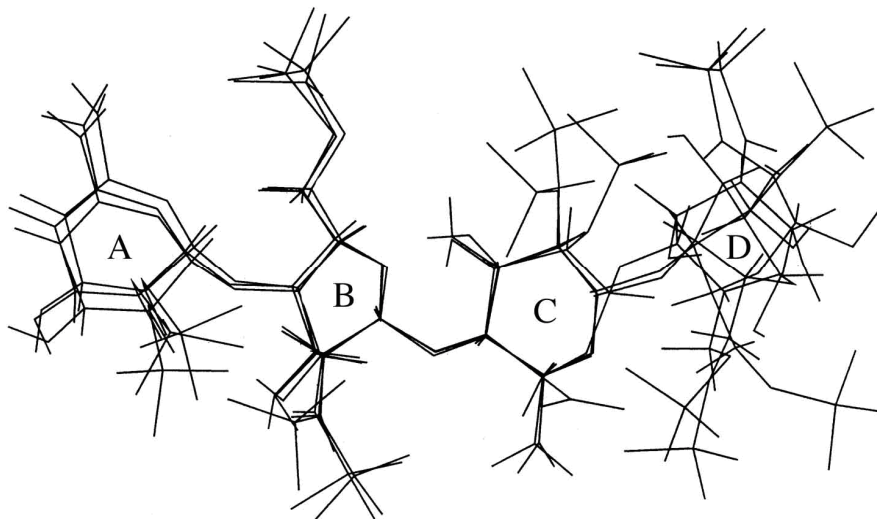
3.3.4. NOESY spektras

Anksčiau nagrinėti dvimačiai spektrai parodo koreliacijas (sąveikas) per cheminius ryšius. Norint nustatyti molekulių konformacijas, yra naudojami spektrai, kuriuose matyti koreliacijos per erdvę. Toks yra NOESY spektras. Šiame spektre protonai, kurie yra erdvėje arti vienas kito (maždaug per 3-5 Å), rodo koreliacines smailes. Iš jų intensyvumo galima nustatyti atstumą tarp jų erdvėje. Smailių intensyvumas labai greitai gęsta didėjant atstumui r tarp branduolių ($\propto r^{-6}$). Daugelis kryžminių COSY smailių yra taip pat matomos NOESY spektruose. 3.11 pav. yra parodytas heparino molekulės NOESY spektras. Matome daug įvairaus intensyvumo kryžminių smailių, kurios yra proporcingos vidutiniam atstumui tarp protonų erdvėje.



3.11 pav. Heparino molekulės (struktūra 3.7 pav.) NOESY spektras (600 MHz spektrometras). Kryžminės smailės rodo tarpprotonines koreliacijas per erdvę (autoriaus duomenys)

NOESY dvimatis spektras kartu su HETCOR ir TOCSY spektrais buvo panaudotas heparino molekulės vandeniniame tirpale erdvinei konformacinei struktūrai nustatyti. Struktūros nustatymo etapai: iš pradžių, naudojant programą Insight II (arba kitas molekulinio modeliavimo programas), yra sukonstruojama heparino molekulės struktūra, atitinkanti standartinius cheminių jungčių ilgius ir sterinius konfliktus. Tada iš NOESY spektro į modelį yra perkeliama erdvinių atstumų ribojimai tarp protonų. Programa pateikia rinkinį galimų molekulės struktūros variantų, kurie gaunami minimizuojant molekulės energiją. Šios struktūros yra dedamos viena ant kitos taip, kad struktūrų vietos, kurios yra panašiai išsidėsčiusios erdvėje, būtų kuo arčiau viena kitos. Trejetas tokių gautų heparino molekulės struktūrų, uždėtų viena ant kitos (*superimposed*), yra parodytos 3.12 pav. Matome, kad centriniai monosacharidų žiedai yra gana nelankstūs, o šoniniai žiedai yra daug dinamiškesni.



3.12 pav. Trys heparino tetramero struktūros gautos minimizavus energiją pagal NOESY spektro rodymus apribojimus. Struktūros uždėtos viena ant kitos naudojant atomus B2, C3 ir C5. Matyti žiedai A, B ir C. Žiedas D yra labai dinamiškas, todėl jo praktiškai nematyti: jo konformacijos yra beveik atsitiktinės

Magnetinis branduolių rezonansas šiuo metu yra vienintelis būdas nustatyti erdvinę atominės skiriamosios gebos makromolekulės struktūrą vandeniniame tirpale. Tai yra didelis privalumas, palyginti su rentgenostruktūrine analize. Be to, analizuojant molekulių, uždėtų viena ant kitos, visumą, galima iš karto matyti, kurios molekulės vietos yra labiau judrios.

3.4. MBR naudojimas baltymo struktūrai ir dinamikai nustatyti

3.4.1. Polipeptidų MBR spektrai

Panašiai kaip ir nagrinėjame heparino molekulės pavyzdyje, baltymų struktūrai ir dinamikai nustatyti yra dažniausiai naudojami COSY, TOCSY ir NOESY spektrai. Sunkiausias uždavinys yra nustatyti, kurios kryžminės smailės priklauso tam tikriems vandeniliams. Net ir nedideliame 100 aminorūgščių baltyme yra šimtai smailių. Kai pavyksta nustatyti, kurios smailės priklauso tam tikriems vandeniliams, baltymas yra modeliuojamas kaip ir anksčiau nagrinėtas heparino tetrameras.

3.2 lentelėje yra parodyti aminorūgščių vandenilių cheminiai poslinkiai tetrapeptide Gly-Gly-Xar-Ala, kai aminorūgštis yra atsitiktinės konformacijos. Baltyme dauguma šių vandenilių poslinkių yra šiek tiek kitokie. Jei visų aminorūgščių vandenilių poslinkiai būtų idealiai vienodi, tai nebūtų įmanoma priskirti kiekvienos smailės tam tikram vandeniliui. Tačiau baltymo aplinka šiek tiek veikia poslinkius.

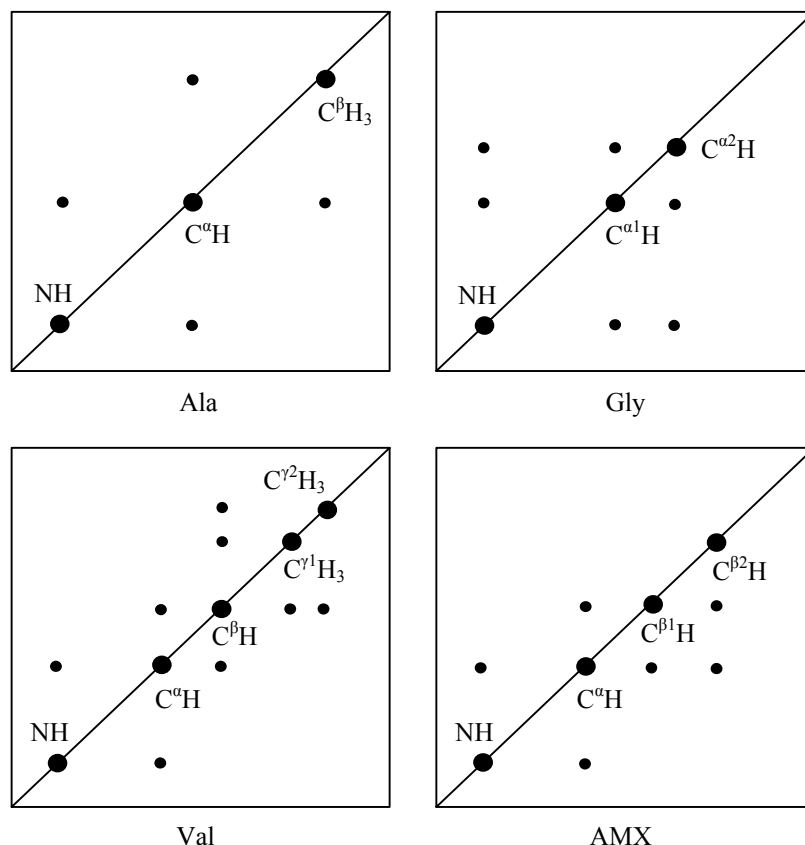
3.2 lentelė. Peptido Gly-Gly-Xar-Ala aminorūgščių vandenilių cheminiai poslinkiai, pamatuoti esant pH 7.0, 35°C temperatūrai (Xaa – matuojamoji aminorūgštis) [7]

Aminorūgštis	Cheminis poslinkis, ppm			
	NH	C ^α H	C ^β H	Kiti
Gly	8,39	3,97		
Ala	8,25	4,35	1,39	
Val	8,44	4,18	2,13	C ^γ H ₃ 0,97, 0,94
Ile	8,19	4,23	1,90	C ^γ H ₂ 1,48, 1,19, C ^γ H ₃ 0,95, C ^δ H ₃ 0,89

Aminorūgštis	Cheminiis poslinkis, ppm			
	NH	C ^α H	C ^β H	Kiti
Leu	8,42	4,38	1,65, 1,65	C ^γ H 1,64, C ^δ H ₃ 0,94, 0,90
Pro (trans)	-	4,44	2,28, 2,02	C ^γ H ₂ 2,03, 2,03, C ^δ H ₂ 3,68, 3,65
Ser	8,38	4,50	3,88, 3,88	
Thr	8,24	4,35	4,22	C ^γ H ₃ 1,23
Cys	8,31	4,69	3,28, 2,96	
Asp	8,41	4,76	2,84, 2,75	
Glu	8,37	4,29	2,09, 1,97	C ^γ H ₂ 2,31, 2,28
Asn	8,75	4,75	2,83, 2,75	N ^γ H ₂ 7,59, 6,91
Gln	8,41	4,37	2,13, 2,01	C ^γ H ₂ 2,38, 2,38, N ^δ H ₂ 6,87, 7,59
Met	8,42	4,52	2,15, 2,01	C ^γ H ₂ 2,64, 2,64, C ^ε H ₃ 2,13
Lys	8,41	4,36	1,85, 1,76	C ^γ H ₂ 1,45, 1,45, C ^δ H ₂ 1,70, 1,70, C ^ε H ₂ 3,02, 3,02, N ^ε H ₃ 7,52
Arg	8,27	4,38	1,89, 1,79	C ^γ H ₂ 1,70, 1,70, C ^δ H ₂ 3,32, 3,32, NH, NH ₂ ⁺ 7,17, 6,62
His	8,41	4,63	3,26, 3,20	C ^{δ2} H 7,14, C ^{ε1} H 8,12
Phe	8,23	4,66	3,22, 2,99	C ^δ H 7,30, C ^ε H 7,39, C ^ζ H 7,34
Tyr	8,18	4,60	3,13, 2,92	C ^δ H 7,15, C ^ε H 6,86
Trp	8,09	4,70	3,32, 3,19	C ^{δ1} H 7,24, C ^{ε3} H 7,65, C ^{ζ3} H 7,17, C ^η H 7,24, C ^{ζ2} H 7,50, N ^ε H 10,22

Natyvios struktūros baltyme cheminiai poslinkiai yra šiek tiek kitokie negu 3.2 lentelėje. Šie nedideli nuokrypiai atskiria kryžminius pikus vieną nuo kito dvimačiuose spektruose ir todėl įmanoma išskirti ir nustatyti šimtus pikų viename spektre.

3.13 pav. yra parodyti keletos aminorūgščių scheminiai idealizuoti COSY spektrai. Dažniausiai yra matomi kryžminiai pikai, kai protonai yra nutolę vienas nuo kito ne toliau negu per tris kovalentines jungtis. Todėl susidaro kryžminis pikas tarp alanino NH ir C^αH protonų, tačiau nėra piko tarp alanino NH ir C^βH₃ protonų.



3.13 pav. Ala, Gly, Val, ir AMX-tipo aminorūgščių COSY spektrų schemas

Didelės sferos, esančios ant ištiržainės, rodo protonų cheminius poslinkius, o maži rutuliai – kryžminius pikus (sąveikos tarp protonų, atskirtų ne toliau negu per tris kovalentinius ryšius). Cheminiai poslinkiai yra sheminiai – ne pagal mastelį [8].

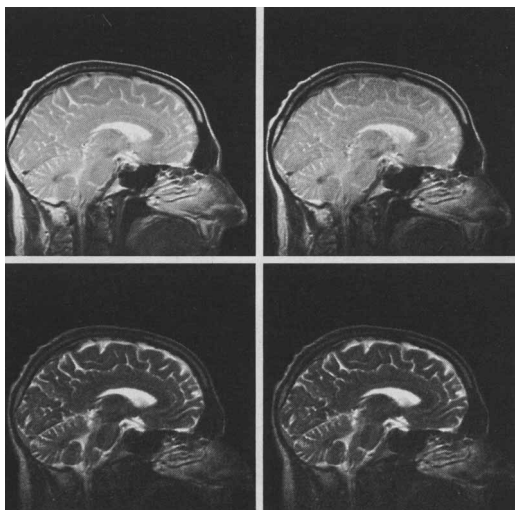
3.4.2. Magnetinio rezonanso tomografijos pagrindai

Lauterbur'as 1973 m. pirmą kartą panaudojo MBR didelių objektų tyrimui. Jis naudojo vandenilio rezonansus, nes gyvuosiuose organizmuose yra daug vandens, be to, vandenilio rezonanso jautrumas didžiausias. Tose organizmo dalyse, kur vandens yra daug, signalas yra stipresnis, o kur mažai (pvz., kauluose) – silpnescnis. Norint, kad tokie tyrimai būtų sėkmingi, reikėjo išspręsti tris problemas. Pirmą, reikėjo sukurti galingą magnetą su pakankamai dideliu tarpu, kad tilptų toks objektas kaip žmogaus kūnas.

Antra, rezonanso sąlyga negali būti vienu metu patenkinta visose didelio organizmo vietose. Todėl MBR tomografijos atvejais tik mažame tūryje vyksta vandens protonų rezonansas vienu metu. Svarbu, kad už nagrinėjamo tūrio ribų esantis vanduo nesukeltų jokio signalo ir nesumažintų vaizdo kokybės. Vienu metu nagrinėjamas tūris gali būti labai mažas, apie 10^{-5} mm^3 . Tai galima vadinti MBR mikroskopija, lyginama su optine mikroskopija. 3.14 pav. parodytuose žmogaus smegenų tomografiniuose vaizduose šis tūris nėra toks mažas, apie 7 mm ilgio ir vieno mm skersmens cilindras. Mažiausiai aštuonių pjūvių reikia, kad būtų visas smegenų vaizdas.

Trečia, vaizdas iš atskirų vietų turi būti kompiuteriu paverstas bendru objekto vaizdu.

Vandens protonų rezonanso relaksacijos laikai priklauso nuo to, kaip vanduo yra prisijungęs prie audinių. Tai irgi yra naudojama atliekant magnetinio rezonanso tomografiją ir suteikiant papildomų detalių apie nagrinėjamą objektą.



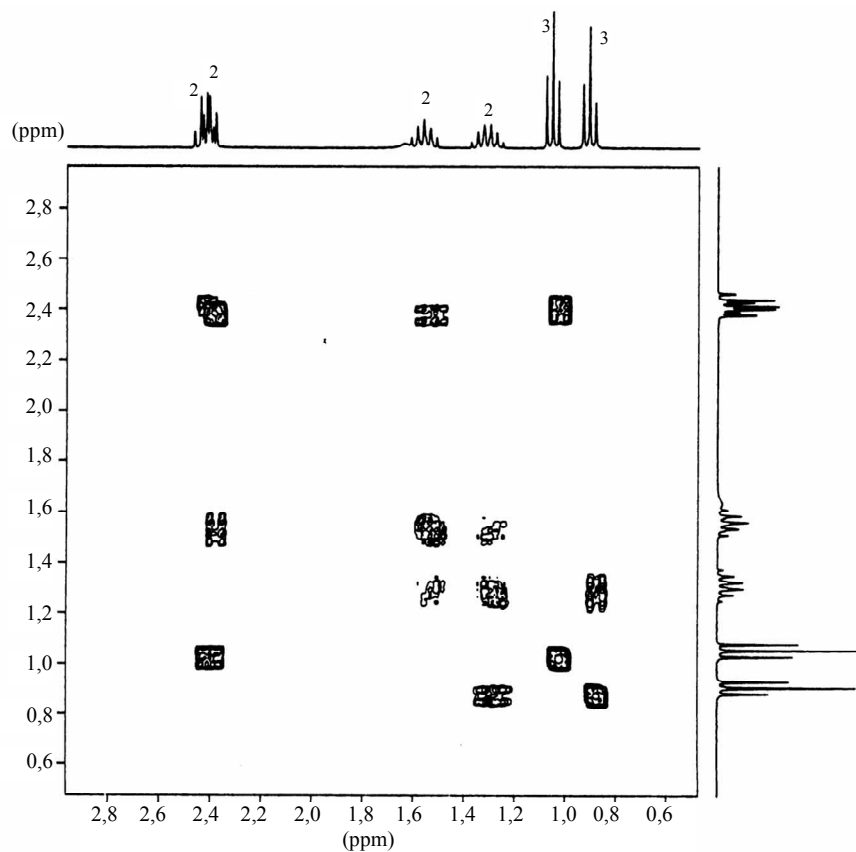
3.14 pav. Žmogaus kaukolės pjūvis, gautas naudojant specialią daugelio pulsų seką ir registruojant aštuonis aidus. Eksperimentas truko apie vienuolika minučių. Tomografas pagamintas Bruker, Karlsruhe-Rheinstetten, turi kriomagnetą, generuojantį 1,5 T magnetinį lauką [6]

3.4.3. MBR metodo santrauka

Šiame skyriuje trumpai nagrinėjome magnetinio branduolių rezonanso metodo taikymą biologinės chemijos problemoms spręsti. Šis metodas yra antras savo svarba struktūrinių tyrimų (po rentgenostuktūrinės analizės) ir nepakeičiamas molekulių dinamikos bei biologinių reakcijų tyrimų metu. Svarbiausia kliūtis, stabdanti dažnesnį šio metodo taikymą, yra didelė aparatūros kaina. Šiuo metu naujausio komercinio MBR spektrometro (apie 900 MHz) kaina siekia keturis milijonus JAV dolerių. Labai brangus yra spektrometro eksploatavimas. Kriomagneto temperatūrai palaikyti reikia didelio kiekio skysto helio.

Paprastas organinių junginių struktūras galima nustatyti ir iš vienmačių spektrų, tačiau dvimatė informacija labai palengvina šį uždavinį. Heparino tetramero spektrų nagrinėjimas parodė, su kokiomis praktinėmis problemomis susiduriama nagrinėjant dvimačius spektrus. Pavyzdžiui, smailės gali persidengti (reikėjo padidinti TOCSY spektro sritį), arba vandens pikas gali būti labai stiprus (kaip NOESY spektre).

Čia nenagrinėjome, kaip sudaromos pulsų sekos norint gauti įvairius spektrus. Išsamesnės informacijos šiais ir kitais MBR klausimais reikėtų ieškoti specialiojoje literatūroje.



3.15 pav. Pasitikrinimui siūlau išspręsti užduotį – nustatyti junginio, kurio cheminė sudėtis yra $C_7H_{14}O$ ir aukščiau pavaizduotas COSY spektras, struktūrą. Įstrižainė eina iš kairiojo viršutinio kampo į dešinįjį apatinį kampą. Skaičiai ties viršutiniu vienmačiu protono spektru rodo integruotą kiekvienos pikų grupės plotą. Pasinaudodami kryžminiais pikais ir cheminiais poslinkiais, nustatykite tikslią cheminio junginio struktūrą.

4. Rentgenostruktūrinė kristalografinė baltymų analizė

4.1. Įvadas

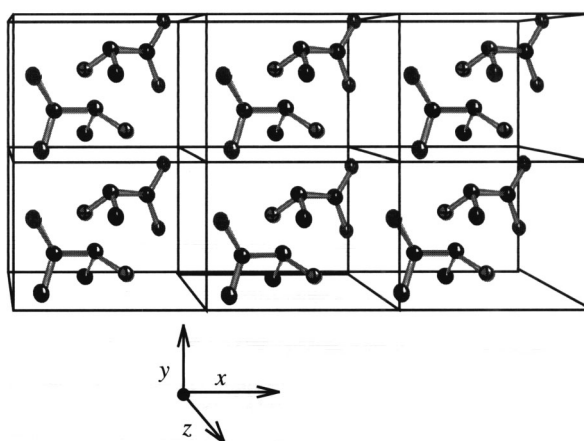
Rentgenostruktūrinė kristalografinė analizė yra labiausiai paplitęs ir seniausias fizikinis metodas, kuris suteikia informacijos apie nagrinėjamos medžiagos atomų ir molekulių tarpusavio išsidėstymo struktūrą. Kaip parodo pats metodo pavadinimas, medžiaga turi būti kristalų pavidalo, kad ją būtų galima tirti šiuo metodu.

Pirmieji mokslininkai, 1913 m. panaudoję rentgeno spindulius valgomosios druskos (NaCl) atominiai struktūrai nustatyti, buvo tėvas ir sūnus William Henry Bragg ir William Lawrence Bragg, už tai gavę Nobelio premiją 1915 m. Nuo to laiko rentgenostruktūrinė analizė tapo vienu iš labiausiai naudojamų biologijoje fizikinių metodų. Mažų molekulių struktūrų nustatymas yra automatizuotas, tačiau makromolekulių kristalinimas ir struktūrų nustatymas gali užimti nuo kelių savaičių iki metų ir reikalauja giliai suprasti metodą.

Šio skyriaus tikslas yra supažindinti su įvairiais rentgenostruktūrinės analizės aspektais, įskaitant kristalų auginimą, rentgeno spindulių difrakciją, elektroninių žemėlapių sudarymą bei galutinių makromolekulių struktūrų interpretaciją ir taikymą biochemijai.

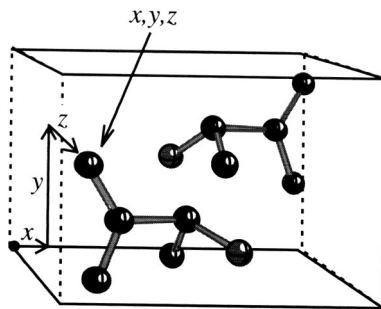
4.2. Kristalinė gardelė

Kristalą sudaro daug identiškų molekulių, kurios išsidėsto periodiškai. Taip būna tada, kai molekulės simetriškai išsidėsto identiškuose blokuose, vadinamuose elementaria kristaline gardelė. Kristale yra transliacinė simetrija. Kiekvienoje elementarioje gardelėje molekulės išsidėsto vienodai, bet vienoje konkrečioje elementarioje gardelėje kelios molekulės gali išsidėstyti skirtingai (4.1 pav.).



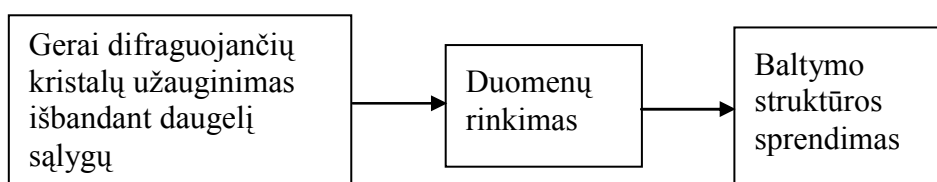
4.1 pav. Aminorūgšties alanino kristalo šešios elementarios gardelės. Kiekviena elementari gardelė yra sudaryta iš dviejų alanino molekulių. Kristale visos gardelės yra identiškos [9]

Norėdami suprasti molekulės erdvinę struktūrą, turime eksperimentiškai nustatyti visų vienos elementarios gardelės atomų koordinates x , y ir z , kaip parodyta 4.2 pav.



4.2 pav. Vieno atomo koordinatės elementarioje kristalinėje gardelėje [9]

Baltymų elementarios kristalinės gardelės yra daug didesnės negu mažų organinių molekulių gardelės. Daugelio medžiagų kristalus išauginti yra sudėtinga. Būdas, kuriuo nustatomos kiekvieno gardelės atomo koordinatės, taip pat yra sudėtingas. 4.3 pav. schemiškai vaizduoja bendrą baltymo struktūros sprendimo strategiją.



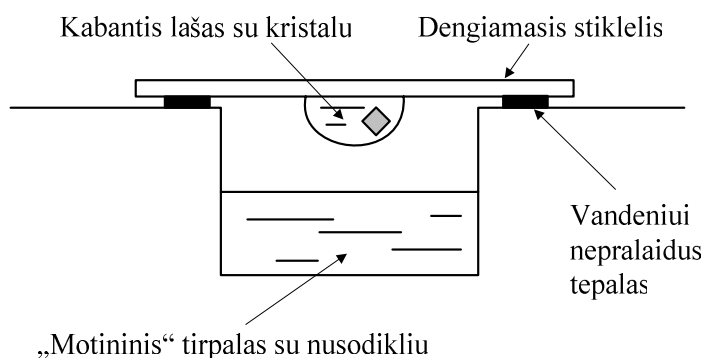
4.3 pav. Bendra baltymo struktūros, taikant rentgenostruktūrinės analizės metodą, sprendimo strategija

Remdamiesi šia schema, aptarsime daugelio sąlygų bandymą auginant baltymo kristalus, tam tikrus reikalavimus, kurių reikia kristalams difraguoti iki reikiamos skiriamosios gebos, nagrinėsime duomenų rinkimą ir baltymo struktūros sprendimą. Skyriaus pabaigoje apibendrinsime, kokią informaciją mums suteikia kristalografinė analizė.

4.3. Baltymų kristalų auginimas

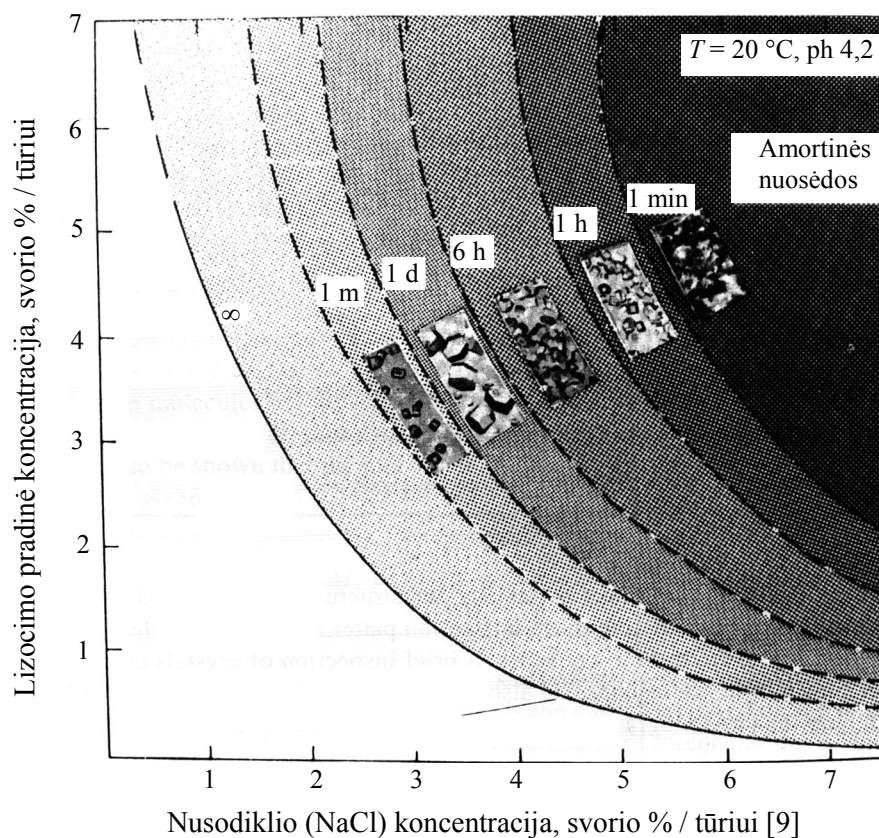
Mažų molekulių kristalai gali būti auginami paruošiant karštą sotų medžiagos tirpalą ir lėtai jį aušinant. Baltymams tokios sąlygos netinka, nes jie denatūruoja esant aukštesnei temperatūrai. Dažniausiai baltymų kristalai auginami ištirpinus išgrynintą baltymą vandeniniame buferyje, į kurį įdėta nusodinančių medžiagų, pvz., amonio sulfato arba polietileno glikolio. Jų koncentracija yra tik šiek tiek mažesnė negu reikia kristalams susidaryti. Tada vanduo yra lėtai pašalinamas kontroliuojamo išgarinimo būdu. Senesnis yra vadinamasis „kabančio lašo“ metodas, nors šiuo metu dažniau naudojamas „sėdinčio lašo“ metodas. Baltymo tirpalo lašas su nusodikliu yra užlašinamas ant dengiamojo stiklo, tada apverčiamas ir uždedamas ant indo su „motininiu“ tirpalu (4.4 pav.), kuriame irgi yra nusodiklio. „Motininiame“ (rezervuaro) tirpale nusodiklio koncentracija yra šiek tiek didesnė negu baltymo laše. Dėl osmosinių slėgių skirtumo vanduo lėtai garuoja iš lašo ir kondensuojasi „motininiame“ tirpale. Lašas mažėja, baltymo koncentracija didėja ir užauga baltymo kristalai. Egzistuoja tik empirinės taisyklės, kokie nusodikliai, buferiai, druskos ir kitos medžiagos padeda išauginti baltymų kristalus.

Tenka bandyti daugybę jų derinių, kol surandamos tokios, kurioms esant užauga tiriamojo baltymo kristalai.



4.4 pav. Baltymo kristalinimas „kabančio lašo“ metodu.

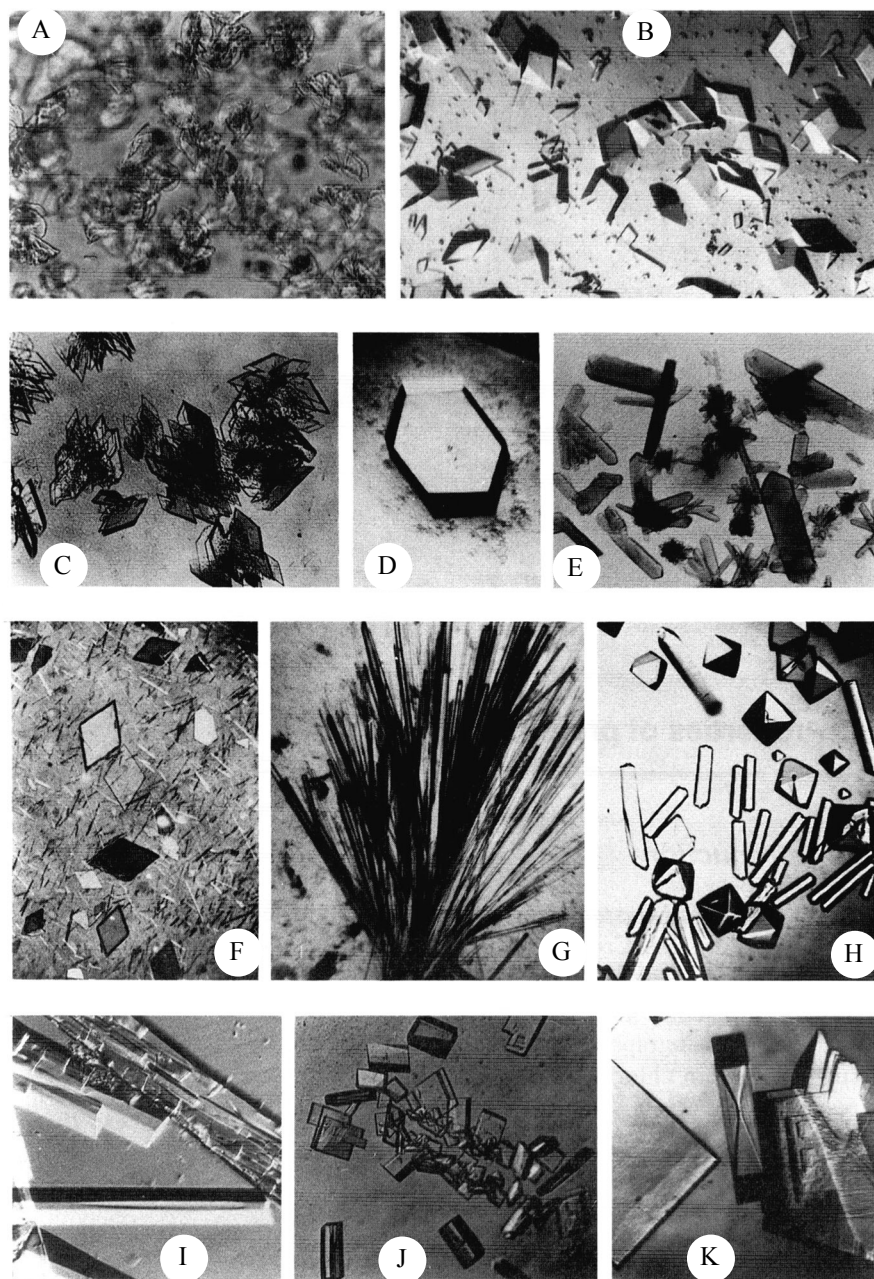
4.5 pav. matome, kad lizocimo baltymo kristalus auginti galimos įvairios sąlygos. Juo didesnė druskos koncentracija, juo greičiau lizocimas iškrenta nuosėdomis. Tačiau jeigu nuosėdos iškrenta per daug greitai, jos būna amorfinės arba sudarytos iš mikrokristalų, netinkamų rentgenostruktūrinei analizei. Geriausios kokybės yra didžiausi kristalai, kurie gaunami, kai jie užauga maždaug per dieną 3-4 proc. NaCl tirpale, tai priklauso nuo baltymo koncentracijos.



4.5 pav. Lizocimo kristalų dydžio priklausomybė nuo kristalinimosi greičio ir baltymo bei nusodiklio (NaCl) koncentracijų. Juo didesnė nusodiklio koncentracija, juo greičiau kristalai auga, tačiau jei tai vyksta per greitai, susiformuoja daugybė mikrokristalų arba tiesiog amorfinės nuosėdos

Baltymų kristalų morfologija yra labai įvairi (4.6 pav.). Norint kad kristalai tiktų rentgenostruktūrinei analizei, jie turi būti pakankamai dideli. Šiuo metu jau pakanka, kad kristalo skersmuo būtų apie 0,1 milimetro. Tačiau tokio dydžio kristalų struktūrai nustatyti dažnai prireikia aukštos kokybės ir didelio pajėgumo spindulių, gaunamų tik sinchrotronuose.

Labai svarbu, kad kristalai difraguotų rentgeno spindulius reikiama skiriamąja geba. Taip pat kristalai turi būti vienetiniai, o ne sulipę iš dviejų ar daugelio mažesnių kristalų.



4.6 pav. Įvairių baltymų kristalai. A – elnio katalazė, B – fruktozės-1,6-difosfatazės iš vištos kepenų trigoninė forma, C – kortizolį sujungiantis baltymas iš jūrų kiaulytės kraujo serumo, D – konkanavalinas B iš pupelių, E – jaučio kepenų katalazė, F – nežinomas baltymas iš ananaso, G – elongacijos faktoriaus Tu iš *Escherichia coli* ortorombinė forma, H – mielių fenilalanino tRNA heksagoniniai ir kubiniai kristalai, I – 5-ojo geno DNR išvyniojimo baltymo iš fago fd kristalai, J – vištos raumenų glicerolio-3-fosfato dehidrogenazės kristalai, K – pupelių kanavalino ortorombiniai kristalai [9]

Labai svarbu, kad kristalai difraguotų rentgeno spindulius reikiama skiriamąja geba. Taip pat kristalai turi būti vienetiniai, o ne sulipę iš dviejų ar daugelio mažesnių kristalų. Neretai auginami kristalai sulimpa ir tampa netinkami analizei.

4.4. Kristalų analizė ir duomenų rinkimas

4.4.1. Rentgeno spindulių kilmė ir panaudojimas

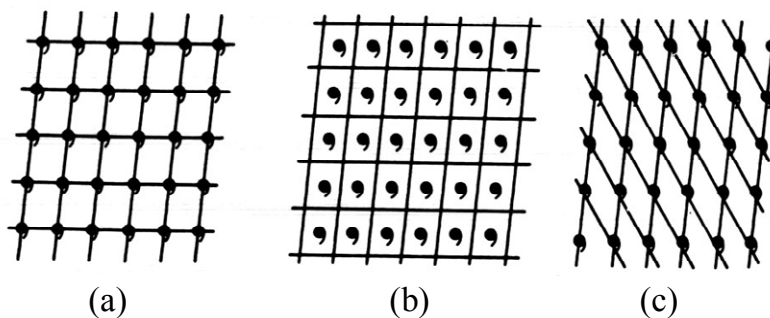
Rentgeno spinduliai elektromagnetinių spindulių skalėje yra tarp ultravioletinių spindulių ir gama spindulių, jų bangos ilgis yra $1 - 100 \text{ \AA}$. Jie yra išspinduliuojami, kai greitai judantys elektronai staigiai sulėtinami. Tada elektronų judėjimo energija virsta Rentgeno spinduliais. Rentgenostruktūrinės analizės metu dažniausiai naudojami spinduliai, kurių bangos ilgis – apie $1 \text{ \AA}$. Nežiūrint to, kad angstromas (*Ångström*) nėra SI sistemos vienetas, jis yra labai patogus ir dažniausiai naudojamas kristalografijos atvejais, kadangi tarpatominiai atstumai kristaluose yra keleto angstromų ilgio ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$).

Kad išspinduliuotų Rentgeno spindulius, elektronai yra įgreitinami elektriniu lauku ir taikomi į metalinį taikinį, kuris juos staigiai sulėtina dėl didelio kiekio susidūrimų su metalo atomais. Po pirmo susidūrimo dauguma elektronų nevysiškai sustoja, todėl susiformuoja spindulių spektras, kurio bangos ilgio minimumas (didžiausia spindulių energija) priklauso nuo įgreitinimo įtampos. Spindulių spektre yra keletas ryškių maksimumų, kurie atsiranda, kai atlekiantis elektronas išmuša elektronus iš stabdančio metalo žemiausių atominių orbitalių (K). Šią vietą užpildo elektronas iš aukštesnės orbitalės (L, M) išskirdamas beveik monochromatinę liniją spektre. Pagrindinės smailės yra α (L→K tranzicijai) ir β (M→K). Kiekviena smailė yra sudaryta iš labai arti esančių dviejų smailių (dupletas) su nevienodu intensyvumu. Kristalų analizei reikia kuo labiau monochromatinių spindulių. β smailės intensyvumas yra maždaug šešis kartus mažesnis, todėl jis yra filtruojamas atrankiaisiais filtrais. Elektronams stabdyti naudojami šie metalai (skliausteliuose - α piko bangos ilgis ir maksimali skiriamoji geba): ^{24}Cr (2,29 Å, 1,15 Å), ^{26}Fe (1,94 Å, 0,95 Å), ^{29}Cu (1,54 Å, 0,75 Å), ^{42}Mo (0,71 Å, 0,35 Å). Dalelių greitintuvai šiuo metu vis dažniau naudojami kaip rentgeno spindulių šaltiniai. Greitintuvuose elektronai arba pozitronai yra įleidžiami į labai ilgą (kilometrų ilgio) vakuuminį žiedą, kuriame jie cirkuliuoja ypatin-
gai dideliu greičiu (įgreitinami galingais radijo dažnio bangų šaltiniais). Išoriniai superlaidūs magnetai išlaiko daleles žiede. Toks greitintuvas veikdamas išskiria *sinchrotroninę radiaciją (spindulius?)* - plataus spektro ypač galingus Rentgeno spindulius (nuo 100 iki 10 000 kartų galingesnius už įprastinius). Pasirenkama norimo bangos ilgio beveik monochromatinė spindulio dalis.

4.4.2. Kristalinės gardelės parinkimas

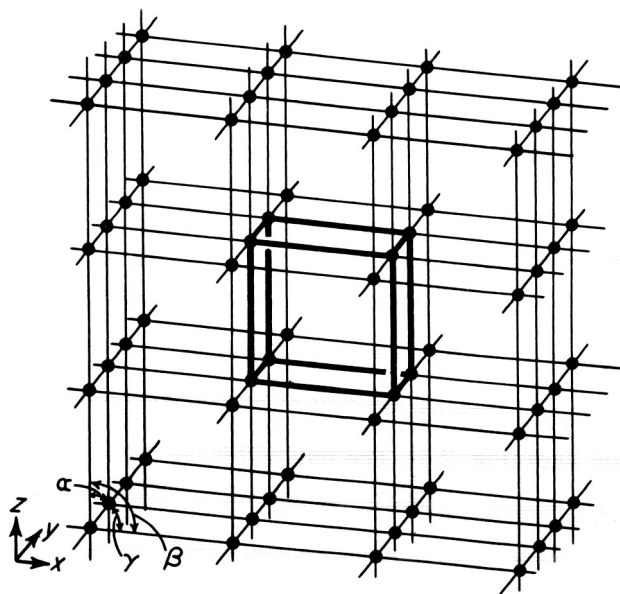
Kaip minėta įvade, kristalas yra trimatė struktūra, maži struktūriniai elementai pasikartoja daug kartų, panašiai kaip namas gali būti pastatytas iš didelio skaičiaus vienodų plytų. Šie struktūriniai elementai („plytos“, „blokai“) yra vadinami elementariomis kristalinėmis gardelėmis (*crystal unit cell*). Visos kristalinės gardelės kristale yra identiškos ir jas stumiant pagal gardelės briaunas a , b ir c suran-

dama lygiai tokia pati gardelė. Kristalas yra vieninga sistema ir šios gardelės yra mūsų dirbtinai išivaizduojami elementai, bet labai svarbūs. Jos sudaro kristalo struktūros koordinačių sistemą. 4.7 pav. yra parodytos trys skirtingai pasirinktos kristalinės gardelės tame pačiame kristale. Šių gardelių tūriai yra vienodi, jeigu visose yra toks pats molekulių skaičius.



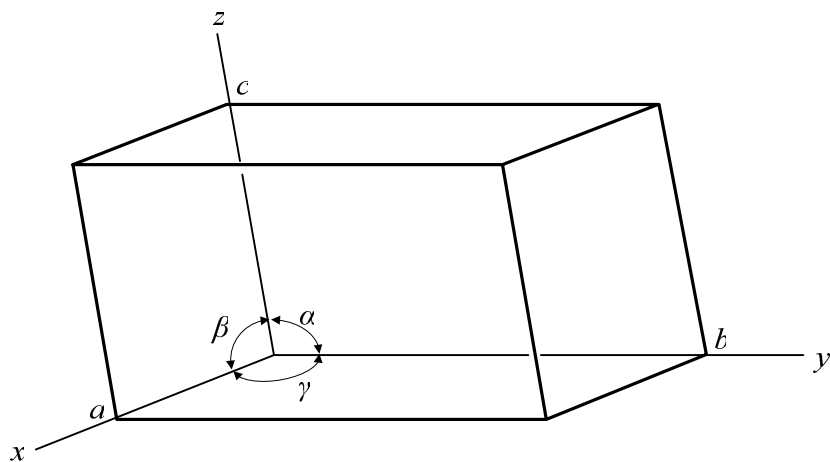
4.7 pav. Trys skirtingai pasirinktos kristalinės gardelės tame pačiame kristale [9]

Pasirinkti gardelę galima įvairiai, bet patogiau naudoti vieną to paties kristalo aprašymo variantą, todėl yra įvairūs susitarimai, kuriam pasirinkimui bus suteikiama pirmenybė. 4.8 pav. matome kristalinę gardelę, pažymėtą riebiu šriftu, ir ją supančias 26 identiškias gardeles, kurios gaunamos pastūmus pradinę gardelę pagal gardelės briaunas a , b ir c .



4.8 pav. 26 identiškios gardelės, kurios gaunamos pastūmus pradinę gardelę pagal gardelės a , b , c briaunas [10]

4.9 pav. parodyta viena gardelė, kurioje kampas tarp a ir b briaunų yra γ , tarp a ir c – β , ir tarp b ir c – α . Šie visi kampai gali būti lygūs 90 laipsnių (tada a , b ir c briaunos sutampa su x , y ir z ašimis), gali ir nė vienas nebūti statusas. Kai briaunos sutampa su ašimis, gardelės matavimas pagal x ašį yra a , pagal y ašį – b ir pagal z ašį – c . Kubinėje gardelėje, kuri yra paprasčiausia išivaizduoti, visi trys matavimai yra lygūs.



4.9 pav. Vienetinė kristalinė gardelė ir ją aprašantys 6 parametrai – briaunų ilgiai a , b ir c ir kampai α , β ir γ [10]

4.4.3. Kristalinių gardelių sistemos ir simetrija

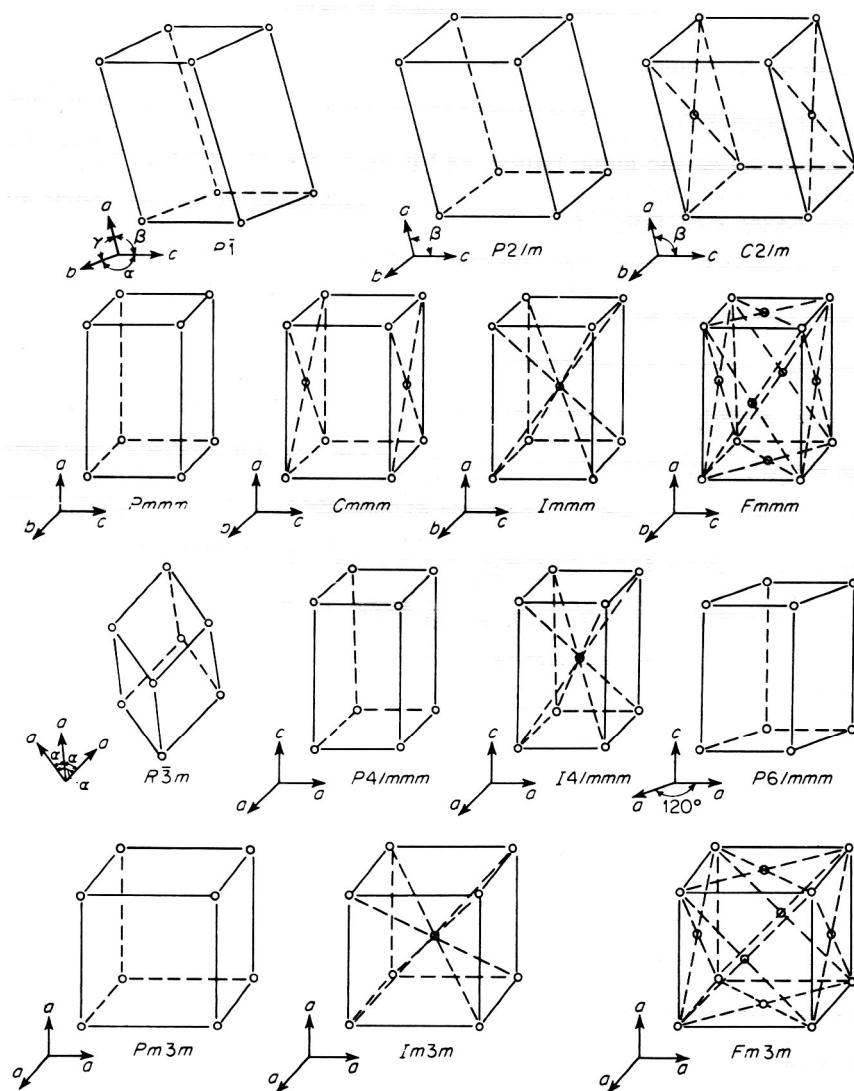
Yra septynios trimatės kristalų sistemos, naudojamos aprašant ir klasifikuojant kristalus. Kaip minėta anksčiau, kristalinė gardelė yra aprašoma šešiais parametrais: trimis briaunų ilgiais (a , b , c) ir trimis tarpbriauniniais kampais (α , β ir γ). 4.1 lentelėje yra surašyti gardelių tipai. Bet kuri gardelė gali būti aprašyta triklininės gardelės matavimais, nes visi šeši parametrai joje skiriasi. Monoklininėje sistemoje pagal susitarimą ašys pasirenkamos taip, kad $\beta > 90^\circ$. Heksagoninės ir tetragoninės sistemų viena ašis taip pat skiriasi nuo kitų savo simetrijos savybėmis. Ši ašis pagal susitarimą yra z . Juo didesnė simetrija, tuo mažiau parametru reikia aprašyti gardelę.

4.1 lentelė. Septynios kristalų sistemos ir jų parametrai

Kristalų sistema	Nepriklausomų parametru skaičius	Parametrai
Triklininė	6	$a \neq b \neq c$; $\alpha \neq \beta \neq \gamma$
Monoklininė	4	$a \neq b \neq c$; $\alpha = \gamma = 90^\circ$; $\beta > 90^\circ$
Ortorombinė	3	$a \neq b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragoninė	2	$a = b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Trigoninė-romboedrinė	2	$a = b = c$; $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Heksagoninė	2	$a = b \neq c$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Kubinė	1	$a = b = c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Gardelės, kurios turi gardelės taškus, arba gardelės mazgus (*lattice points*), taškai pažymėti mažais apskritimais, 4.10 pav., tik vienietinės kristalinės gardelės kampuose, yra vadinamos *primityvio-
mis*. Jos žymimos raidė P prieš simetrijos simbolius (išskyrus romboedrinę gardelę, kur naudojama raidė R). Yra septynios primityvios gardelės, žymimos $P\bar{1}$, $P2/m$, $Pmmm$, $P4/mmm$, $R\bar{3}m$, $P6/mmm$, ir $Pm3m$. Egzistuoja ir septynios *neprimityvios* gardelės, priklausančios septynioms kristalinėms simetrijoms. Šios gardelės turi du (*dvigubai primityvios*), tris (*trigubai primityvios*), ir daugiau gardelių taškų vienietinėje gardelėje. Iš viso egzistuoja 7 primity-

vios ir 7 neprimityvios Bravais'o gardelės. Neprimityvios gardelės su taškais ant gardelės sienelių vadinamos A , B , C , tai priklauso nuo to, ar bc , ac , ar ab sienelėse yra šie taškai. Jei taškas yra gardelės centre, ji vadinama I (*Inner*), o jei visos sienos turi taškus centruose, gardelė vadinama F . Bravais'o (gardelės pavaizduotos 4.10 pav.).

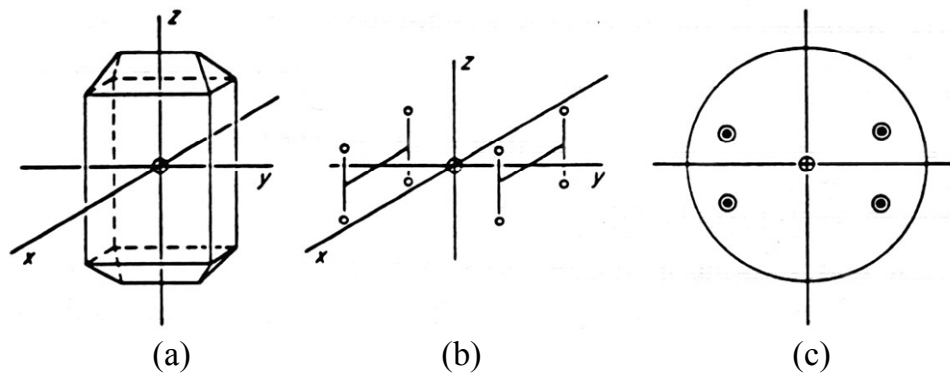


4.10 pav. Bravės (Bravais) gardelės [10]

Esant bet kokiam taškų išsidėstymui, galima pasirinkti primityvią triklininę gardelę, neatsižvelgiant į kristalo simetriją. Tačiau jeigu neatsižvelgtume į simetriją, tai prarastume visus supaprastinimus, kuriuos suteikia kristalų klasifikacija (4.1 lentelė). Todėl pasirenkant gardelę, yra sutarta atsižvelgti į simetriją. Kai yra galimybė dvejopai pasirinkti gardelę, egzistuoja susitarimai. Pavyzdžiui, jei tik įmanoma, gardelė visada yra pasirenkama taip, kad ji nebūtų B .

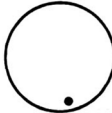
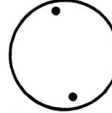
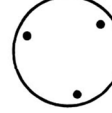
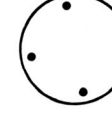
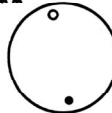
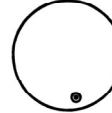
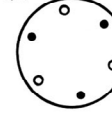
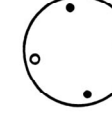
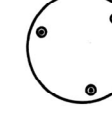
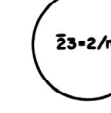
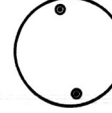
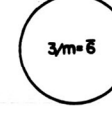
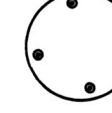
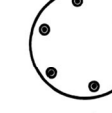
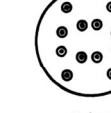
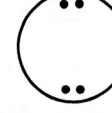
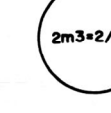
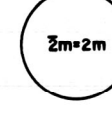
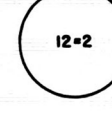
Galima įrodyti, kad kristalo paviršiaus plokštumos tarpusavyje yra susijusios tokiais pačiais simetrijos reiškiniais kaip ir gardelės sienelės, t.y. rotacijos ašimis, veidrodžiais, simetrijos centrais ir rotacijos inversinėmis ašimis. Todėl kristalai gali būti klasifikuojami remiantis simetrijos grupių reiškiniais, siejančiais kristalų paviršius. Kiekviena šių grupių yra vadinama *taškine grupe* ir atitinka vieną galimą unikalią kristalografinių simetrijos reiškinų derinį.

Norėdami lengviau įsivaizduoti taškų grupes, panagrinėkime 4.11 pav. Matome, kad kristalo paviršiai yra atspindėti xy , xz ir yz plokštumose, t.y. egzistuoja trys viena kitai statmenos veidrodinės plokštumos. Paveikslo viduryje pažymėti taškai susiję tokiais pačiais simetrijos reiškiniais kaip ir (a) dalyje. O (c) dalyje yra plokštuminis tų pačių reiškinų vaizdas.



4.11 pav. Taškinių grupių vaizdavimo plokštumoje paaiškinimas [10]

4.12 pav. yra pavaizduoti visi galimi taškų deriniai. Tokios yra 32 taškinių grupių simetrijos. Jos sugrupuotos kolonomis pagal pagrindines ašis, kurios yra statmenos jūsų skaitomam knygos puslapiui. Pirmoje eilutėje pavaizduota tik pagrindinė simetrijos ašis. Tolesnėse eilėse papildomos simetrijos yra pridedamos kaip pavaizduota kairėje. Iš 42 gautų derinių tik 32 yra unikalios taškų grupės. Likusios dešimt yra ekvivalentės, tai rodo lygybės ženklas.

	Triklininė	Monoklininė Ortorombinė	Trigoninė	Tetragoninė	Heksagoninė	Kubinė
n	 1	 2	 3	 4	 6	 23
$\bar{n}$	 1	 $\bar{2}=m$	 $\bar{3}$	 $\bar{4}$	 $\bar{6}$	 $\bar{2}3=2/m3$
n/m	 $1/m=\bar{2}$	 $2/m$	 $3/m=\bar{6}$	 $4/m$	 $6/m$	 $2/m3$
nm	 $1m=\bar{2}$	 $2m=mmm$	 $3m$	 $4m=4mm$	 $6m=6mm$	 $2m3=2/m3$
$\bar{n}m$	 $\bar{1}m=2/m$	 $\bar{2}m=2m$	 $\bar{3}m$	 $\bar{4}m=\bar{4}2m$	 $\bar{6}m=\bar{6}m2$	 $\bar{4}3m$
$n2$	 $12=2$	 $22=222$	 32	 $42=422$	 $62=622$	 $432=43$
n/mn	 $1/m=2m$	 $2/mn=mmm$	 $3/mn=6m$	 $4/mn=4/mmm$	 $6/mn=6/mmm$	 $4/m3m=m3m$

4.12 pav. 32 taškinių grupių vaizdas plokštumoje [10]

Parinkdami vieną iš 32 taškų grupių ir vieną iš 14 Bravais'o gardelių, galime gauti 230 unikalių taškų išsidėstymų erdvėje. Šie išsidėstymai yra vadinami *erdvinėmis grupėmis (space group)*, kurios aprašo visus galimus būdus, kaip išdėstyti identiškus objektus begalinėje gardelėje.

4.4.4. Rentgeno spindulių difrakcija, Brego dėsnis

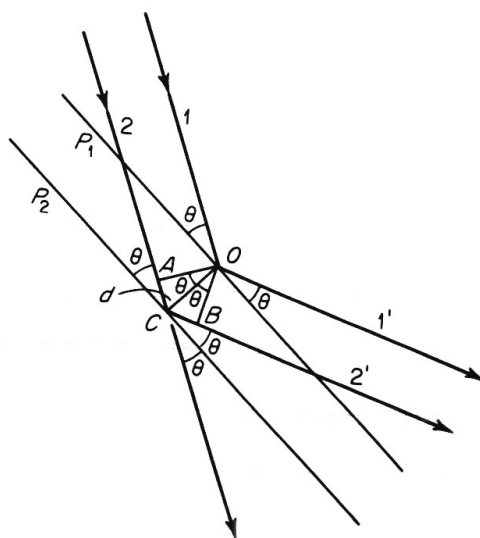
Laue (Max von Laue) 1912 m. parodė, kad kristalai difraguoja rentgeno spindulius. Rentgeno spinduliai jau buvo žinomi nuo 1895 m. (atrado Konradas Rentgenas (Conrad Wilhelm Röntgen)), bet jų fizikinė prigimtis nebuvo žinoma. Bandant nustatyti, ar rentgeno spinduliai yra dalelės, ar bangos, buvo daromi įvairūs bandymai. Bregas (sir W. L. Bragg) pastebėjo panašumą tarp kristalų difrakcijos ir įprastinio atspindžio ir išvedė paprastą lygtį, kuri aprašo difrakciją kaip atspindį nuo gardelės plokštumų.

Jeigu du rentgeno spinduliai (1) ir (2) ant dviejų plokštumų P_1 ir P_2 , tarp kurių yra atstumas d (4.13 pav.), krenta kampu θ , tai elektronai, esantys taškuose O ir C, pradės vibruoti, ir vibruojantys krūviai skleis spindulius visomis kryptimis. Ta kryptimi, kuria susidarys antriniai spinduliai 1' ir 2', tarsi atspindėję nuo plokštumų kampu θ , susidarys maksimalaus intensyvumo difragavęs spindulys, jeigu spindulių 1' ir 2' fazės sutaps. Nubrėžus aukštines iš O į A ir B, aišku, kad $\angle AOC = \angle BOC = \theta$. Todėl $AC = BC$, ir bangos spindulyje 2' sutaps faze su spinduliu 1', jei $AC + CB (=2AC)$ yra sveikas bangos ilgių λ skaičius. Tai išreiškiama lygtimi:

$$2AC = n\lambda. \quad (1)$$

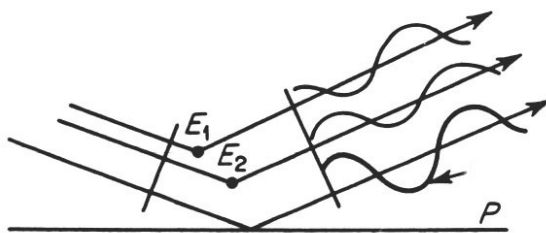
Čia n yra sveikas skaičius. $AC/d \equiv \sin \theta$, todėl pakeitę gauname Brego dėsnį:

$$2d \sin \theta = n\lambda. \quad (2)$$



4.13 pav. Difrakcijos sąlygos (Brego dėsnis) [10]

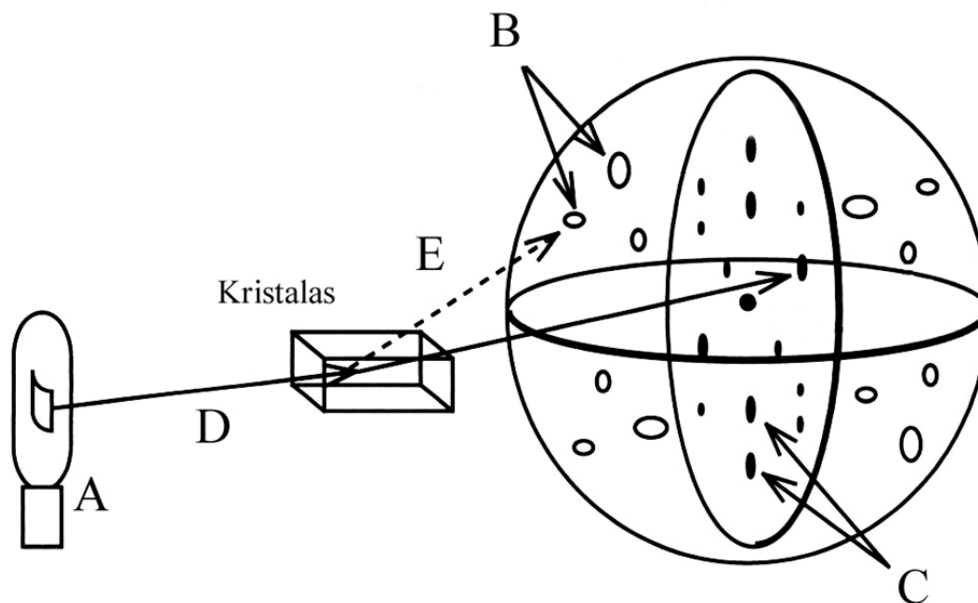
Nors 4.13 pav. yra parodytas konkretus difrakcijos atvejis, dėsnis tinka bet kokiai plokštumose esančių taškų porai. Nustatant Brego dėsnį, elektronų tankis buvo „paskirstytas“ abiejose plokštumose. Tikrovėje elektronų tankis yra pasiskirstęs ir tarp plokštumų, jis didesnis aplink kristalo atomų branduolius. Tačiau dėl kristalo periodiškumo tam tikromis kryptimis nuo kristalo plokštumų atspindi Rentgeno spinduliai (tai vyksta, kai patenkinamos Laues (von Laue) sąlygos).



4.14 pav. Visų kristalo taškų išsklaidyti spinduliai susisumuoja ir, jei patenkinamos Laues sąlygos, dėl konstruktyvios interferencijos gali atsirasti atspindys.

4.4.5. Duomenų rinkimas, skiriamoji geba

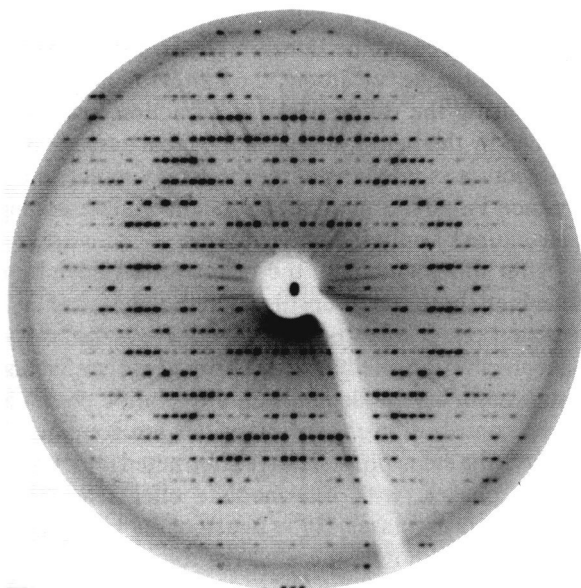
Baltymo kristalas, esantis buferio laše, yra dedamas į kapiliarinį vamzdelį, kuris yra pritvirtinamas prie *goniometrinės galvutės* (*goniometer head*). Goniometrinė galvutė yra prietaisas, galintis pasukti kristalą pagal visas tris ašis taip, kad kristalas išliktų toje pačioje vietoje, Rentgeno spindulio kelyje. Perėjusi per kristalą tik nedidelė dalis spindulių difraguoja. Šie įvairiais kampais nukrypę spinduliai yra išmatuojami detektoriumi (4.15 pav.). Difragavę spinduliai detektoriuje sukelia *atspindžius*, kurių intensyvumas skiriasi. Šiame pav. detektorius yra schemiškai parodytas kaip vertikalus ovalas su pripildytais atspindžiais, kurie yra fiksuojami.



4.15 pav. Kristalografinių duomenų rinkimas [9]

Kristalas difraguoja rentgeno spindulius. Išsklaidyti spinduliai sukelia skirtingo intensyvumo signalus detektoriuje. Tik dalis atspindžių matomi vienu metu. Visi atspindžiai gali būti užfiksuoti tik stumdant detektorių ir sukiojant kristalą. A – rentgeno spindulių šaltinis, B – neužregistruoti atspindžiai, C – užregistruoti atspindžiai, D – spindulys, einantis iš rentgeno spindulių šaltinio, E – difragavęs spindulys.

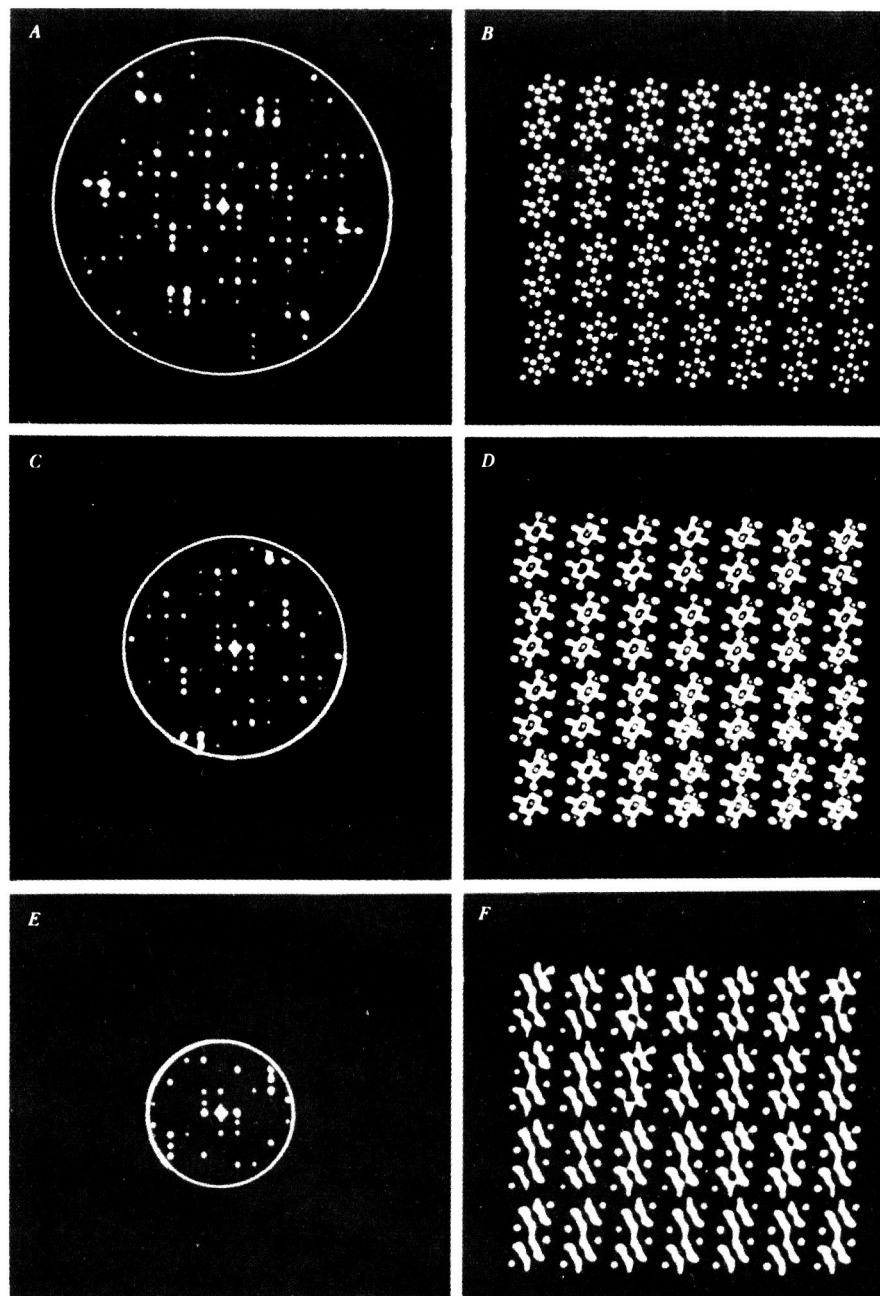
4.16 pav. parodytas baltymo kristalo Rentgeno difrakcijos vaizdas, užfiksuotas detektoriuje. Tamsios dėmės parodytos ten, kur pateko Rentgeno spinduliai, o dėmės dydis ir tamsumas yra proporcingas perėjusio spindulio intensyvumui. Šios dėmės yra vadinamos *atspindžiais* (*reflections*), nes jos atsiranda tarsi būtų atspindėjusios nuo atomų plokštumų kristale. Matome skirtingo intensyvumo atspindžius. Balta figūra, einanti iki centro, yra metalinio ekrano, kuris neleidžia patekti pirminiam, arba tiesioginiam spinduliui į detektorių, šešėlis. Pačiame centre yra juodas taškas, sukeltas nedidelės dalies pro ekraną praėjusio pirminio spindulio (*direct beam, incident beam*).



4.16 pav. Rentgeno difrakcijos fotografija [10]

4.16 pav. parodyta difrakcinio vaizdo, gauto tiriant poras formuojančio kolicino *A* baltymo fragmento kristalus, $h0l$ plokštuma. Elektroninis detektorius išmatuoja kiekvieno atspindžio padėtį bei intensyvumą ir perduoda šią informaciją kompiuterinei duomenų analizei. Naudojant monochromatinį šaltinį ne visi atspindžiai gali būti stebimi vienu metu (vienoje kristalo orientacijoje), todėl norint užrašyti pilną difrakcijos duomenų rinkinį, kristalas turi būti sukiojamas ir užregistruojama daug tokių paveikslų, koks parodytas 4.16 pav.

Difrakcinio vaizdo kraštuose esantys atspindžiai turi informaciją apie smulkesnes struktūros detales. Juo didesniu kampu difragavę spinduliai yra užfiksuojami, juo didesnė yra gaunamos struktūros skiriamoji geba (*resolution*). 4.17 pav. yra palyginti keli skirtingos skiriamosios gebos difrakciniai vaizdai (kairėje pusėje). Dešinėje pusėje parodytos struktūros, gaunamos naudojant difrakcinius vaizdus. Juo mažesniame rate esančius difrakcinius duomenis naudojame, juo mažiau struktūrinių detalių galime išžiūrėti, t.y. juo mažesnė yra skiriamoji geba.



4.17 pav. Struktūros skiriamoji geba [9]

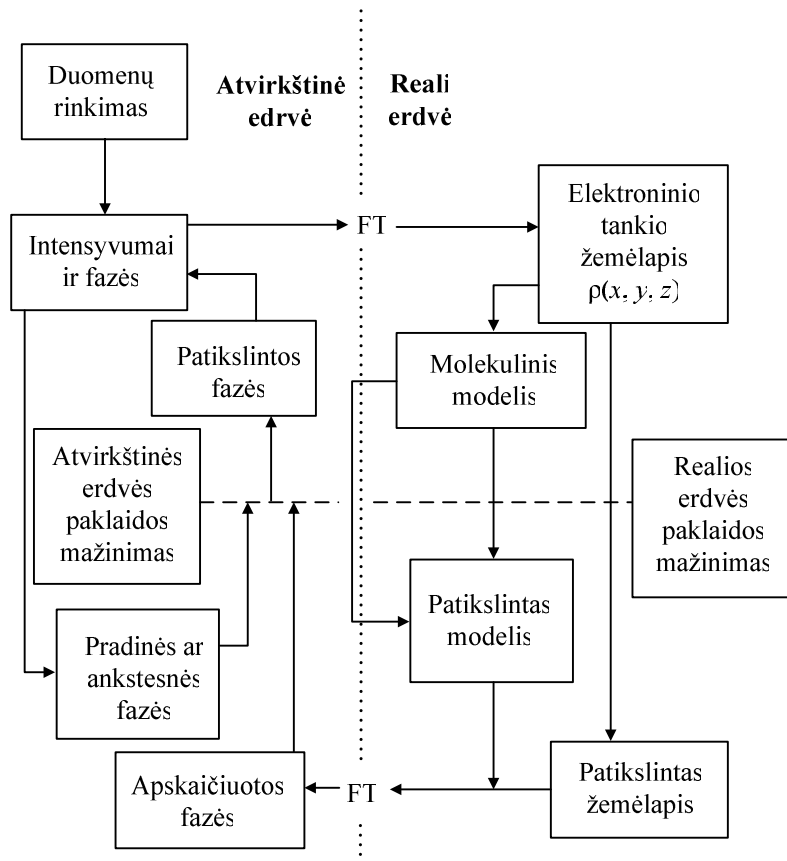
4.17 pav. kairėje yra parodyti trys difrakciniai vaizdai, o dešinėje – struktūros, gautos naudojantis šiais vaizdais. Juo labiau nutolusius nuo centro atspindžius naudojame analizei, juo daugiau detalių sužinome apie nagrinėjamą struktūrą, t.y. tuo didesnė yra gautos struktūros skiriamoji geba.

Panašiai kaip ir optinės mikroskopijos atveju, skiriamoji geba, atliekant rentgenostruktūrinę analizę, negali būti žymiai geresnė už spindulio bangos ilgį. Kaip rašyta anksčiau, rentgeno spindulių, naudojamų analizei, bangos ilgis yra $1 \text{ \AA}$ eilės, o maksimali skiriamoji geba, kurią galime pasiekti yra apie $0,5 \text{ \AA}$. Reali skiriamoji baltymų geba yra dar mažesnė, dažniausiai apie $2 \text{ \AA}$. Regimosios šviesos bangos ilgis yra apie 500 nm , o maksimali optinių mikroskopų skiriamoji geba yra apie vieną mikroną. Todėl mažesnių objektų negalime išžiūrėti paprastu optiniu mikroskopu.

4.5. Baltymo struktūros sprendimas

4.5.1. Įvadas

Surinkus duomenis, sprendžiama baltymo struktūra. 4.18 pav. pavaizduota bendra sprendimo strategija, sudaryta iš daugelio etapų, kuriuos nagrinėsime išsamiau. Kairėje vertikalios punktyrinės linijos pusėje parodyti veiksmai, atliekami atvirkštinėje erdvėje (su difrakciniais atspindžiais), o dešinėje pusėje – atliekami realioje erdvėje (su realia kristalo struktūra). Matematinis veiksmas, kuriuo pereinama iš realios į atvirkštinę erdvę ir atgal, yra vadinamas *Furjė (Fourier) transformacija (FT)*.



4.18 pav. Baltymo struktūros sprendimo bendra strategija [9]

4.5.2. Struktūriniai faktoriai: atspindžių banginis aprašymas

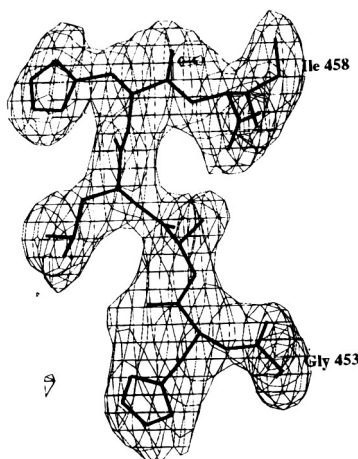
Kiekvienas atomas kristalinėje gardelėje veikia kiekvieną atspindį difrakciniame vaizde. Kiekvieną difragavusį rentgeno spindulį, sukėlusį atspindį difrakciniame vaizde, galime aprašyti Furjė eilutėmis. Furjė eilutės, aprašančios difragavusį spindulį, yra vadinamos struktūrinio faktoriaus lygtimis. Atspindžio hkl apskaičiuota Furjė suma yra vadinama struktūriniu faktoriumi, koeficientu, daugikliu F_{hkl} . Jeigu kristalinėje gardelėje yra šeši atomai nuo A iki F, ir jeigu atomo A difrakciją pažymime f_A , tada vienas difragavęs spindulys, sukeliantis vieną atspindį, gali būti aprašytas tokia struktūrinio elemento lygtimi:

$$F_{hkl} = f_A + f_B + \dots + f_F \quad (3)$$

Struktūrinio elemento lygtis (3) rodo, kad kiekvienas atspindys difrakciniame vaizde yra visų kristalinės gardelės atomų difrakcijos rezultatas.

4.5.3. Elektroninio tankio žemėlapiai

Rentgeno spindulys, einantis per kristalą, difraguoja dėl sąveikos su elektronais, esančiais kristale. Todėl rentgenostruktūrinės analizės eksperimentinis rezultatas yra elektronų išsidėstymo nustatymas. Šis elektronų išsidėstymas (arba tankis) atspindi molekulės formą, panašią į van der Valso (van der Waals) paviršiaus formą. Kristale baltymų molekulės yra išsidėsčiusios periodiškai, todėl elektronų tankis gali būti aprašytas matematiškai kaip periodinė funkcija $\rho(x, y, z)$. Ši funkcija aprašo elektronų tankį visoje kristalinėje gardelėje. 4.19 pav. parodytas grafinis tokios funkcijos vaizdas. Galutinis kristalografijos tikslas yra įstatyti realią cheminę struktūrą į šį elektroninio tankio žemėlapi, kaip 4.19 pav. yra parodytas keletas aminorūgščių peptidas (glicinas-histidinas-alaninas-valinas-histidinas-izoleucinas).



4.19 pav. Baltymo fragmento elektroninio tankio kontūrinis žemėlapis su jį atitinkančiomis cheminėmis aminorūgščių struktūromis [13]

Elektroninio tankio žemėlapis yra periodinė funkcija, kurią galima aprašyti Furjė eilutėmis. Kaip galima parašyti kiekvieno atomo struktūrinio elemento lygtį, taip galima parašyti ir kiekvieno erdvės elemento kristalinėje gardelėje lygtį. Kiekvienas Furjė eilutės dėmuo gali būti parašytas taip, kad jis atspindėtų tam tikro erdvės elemento elektronų difrakciją (tankį). Jeigu gardelė yra padalyta į n elementų ir vidutinis elektronų tankis elemente m yra ρ_m , tada vienas difraguotas spindulys gali būti aprašytas struktūrinio elemento lygtimi:

$$F_{hkl} = f(\rho_1) + f(\rho_2) + \dots + f(\rho_m) + \dots + f(\rho_n) \quad (4)$$

Taigi gauname daug lygčių, aprašančių atspindžių priklausomybę nuo elektronų tankio. Kiekvieno atspindžio intensyvumas suteikia informacijos apie Furjė dėmens amplitudę. Kiekvienas dėmuo yra kompleksinis skaičius, kuriam aprašyti reikia dviejų dalių – realiosios ir menamosios, arba amplitudės ir fazės. Tačiau detektorius nesuteikia informacijos apie atspindžio fazę, kuri yra būtina, kad iš struktūrinio elemento lygčių apskaičiuotume elektroninio tankio žemėlapi.

4.5.4. Fazių nustatymas

Elektroninio tankio žemėlapi $\rho(x, y, z)$ su difrakciniu vaizdu sieja lygtis:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (5)$$

Čia h , k ir l yra atspindžių indeksai, o F_{hkl} yra struktūrinis elementas, aprašantis atspindį. Kiekvienas struktūrinis elementas išsamiai aprašo difragavusį spindulį, kuris sukelia atspindį hkl . Jo dažnis yra toks pat, kaip ir rentgeno spindulių šaltinio, o jo amplitudė yra proporcinga $(I_{hkl})^{1/2}$, t.y. atspindžio hkl pamatuoto intensyvumo I_{hkl} kvadratinei šakniai. Tačiau fazė yra nežinoma, o ji yra būtina modeliui sudaryti. Fazės turi būti išspręstos kiekvienam iš tūkstančių atspindžių.

Fazės gali būti nustatomos daugkartinio izomorfinio pakeitimo (*multiple isomorphous replacement*, MIR), arba molekulinio pakeitimo (*molecular replacement*) būdu. Jeigu egzistuoja išspręsta struktūra, kurios baltymo seka yra homologiška nagrinėjamam baltymui ir jos kristalinė gardelė yra tokia pati, tada galima naudoti molekulinio pakeitimo būdą. Tokiu atveju išspręsto baltymo struktūra yra talpinama į nagrinėjamo baltymo kristalinę gardelę, apskaičiuojamos pirminės fazės. Vėliau kiekviena fazė yra tikslinama (*refinement*).

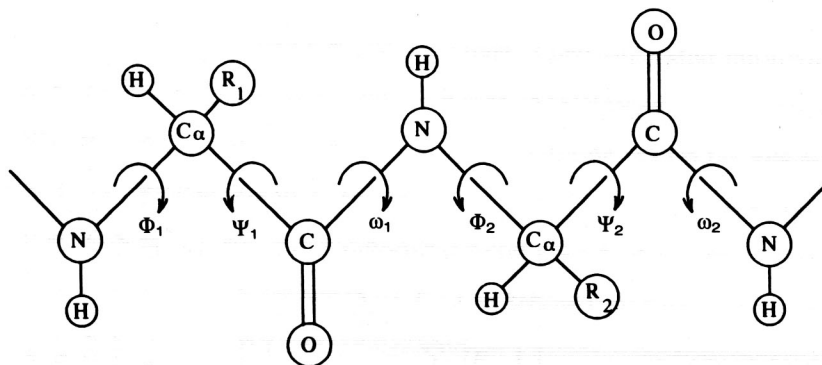
Jeigu nėra panašios išspręstos struktūros (taip dažniausiai ir būna), tada fazės nustatomos izomorfinio pakeitimo būdu, naudojant sunkiuosius metalus. Baltymo kristalai yra dedami į praskiestą Hg, Pt arba Au jonų tirpalą tikintis, kad tam tikras jonas specifiškai prisijungs prie konkrečios baltymo vietos ir nepakeis nei baltymo konformacijos, nei kristalinės gardelės. Gyvsidabrio jonai specifiškai prisijungia prie cisteino SH grupių, todėl kartais cisteinas yra specialiai įvedamas į baltymą, naudojant molekulinės biologijos metodus. Jeigu toks prisijungęs sunkusis atomas pakankamai veikia visus (daugelį) atspindžius, tada galima nustatyti jų fazę vektorinės sumos būdu. Dažniausiai reikia bent kelių kristalų su sunkiaisiais metalais. Sunkieji metalai būtini, nes tik didelės masės atomai pastebimai veikia atspindžių intensyvumą. Pastaruoju metu dažniausiai naudojamas fazių nustatymo metodas yra daugelio bangos ilgių anomalios difrakcijos eksperimentas (MAD, *multiwavelength anomalous diffraction*).

4.5.5. Molekulinio modelio sudarymas ir tikslinimas

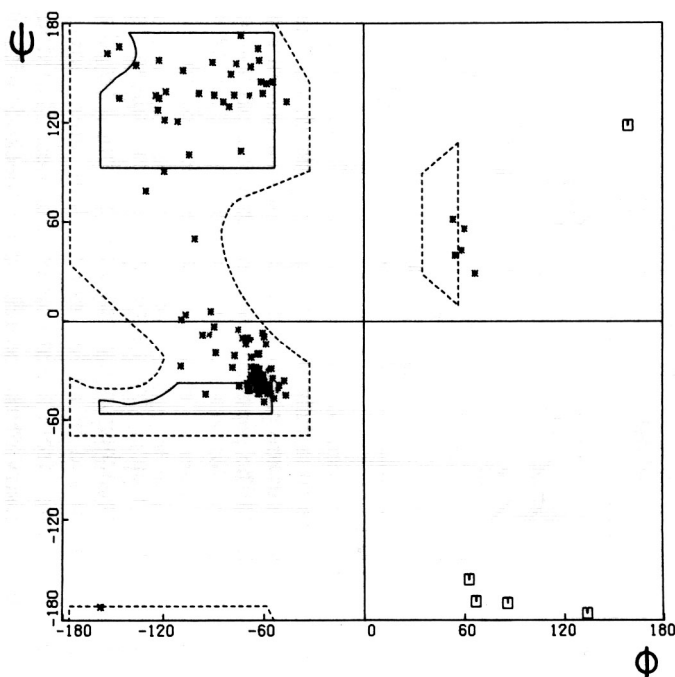
Pirmasis elektroninio tankio žemėlapis gali būti gana neinformatyvus. Jis turi būti tobulinamas iteraciniu būdu, tiksliau nustatant fazes. Fazės tikslinamos elektronų tankio žemėlapio modifikacijos metodais (*density modification*). Modelis gali būti tikslinamas kvadratų sumos mažinimo metodu naudojant baltymo atomų, sustatytų į elektroninio tankio žemėlapi, koordinates. 4.18 pav. parodyta veiksmų schema, kuriais sudaromas aukštos kokybės baltymo modelis. Vertikali punktyrinė linija skiria veiksmus, atliekamus atvirkštinėje erdvėje (kairėje), nuo veiksmų, atliekamų realioje erdvėje (dešinėje). Tikslinant atvirkštinėje erdvėje tobulinamos intensyvumų ir fazių reikšmės, o realioje erdvėje stebima,

kad modelis kuo tiksliau atitiktų elektroninio tankio žemėlapi ir kovalentinių ryšių ilgiai, kampai ir sukimo kampai būtų realistiški.

4.20 pav. parodytas baltymo grandinės fragmentas. Peptidinio ryšio sukimo (torsinis) kampas beveik visada lygus 180 laipsnių, t.y. NH ir CO grupės išsidėsčiusios plokštumoje, o H ir O atomai nutolę kuo toliau vienas nuo kito (taip yra dėl to, kad peptidinis ryšys yra iš dalies dvigubas). Tačiau kitų dviejų jungčių sukimo kampai (ψ ir ϕ) gali kisti, jie nevienodi α spiralėje ir β struktūroje. 4.21 pav. pavaizduotas Ramačandrano žemėlapis (*Ramachandran map*), kuriame parodytos dažniausios šių sukimo kampų vertės. Pavyzdžiui, α spiralės ϕ kampas yra maždaug nuo -50 iki -150 laipsnių.



4.20 pav. Baltymo peptidinės grandinės sukimo kampų ψ ir ϕ apibrėžimas [13]



4.21 pav. Ramačandrano žemėlapis, parodantis dažniausias sukimo kampų ψ ir ϕ vertes baltymų struktūrose [13]

Nors α spiralėse ir β sluoksniuose vyrauja gana griežtai apibrėžtos kampų vertės, tačiau baltymuose įmanomos įvairios vertės, ypač glicine, kur šoninė grupė (vandenilio atomas) beveik nesudaro sterinio trukdymo.

4.2 lentelė. Kristalografinių duomenų rinkimo statistikos pavyzdys

Matuojamas dydis	Vertė
sujungimo R-faktorius (remiantis I)	0,0426
Skiriamosios gebos riba	2,2 Å
Stebėtų atspindžių skaičius	20 478
Unikalių atspindžių skaičius	5 473
Vidutinis kiekvieno atspindžio stebėjimų skaičius	4,0
Proc. stebėtų/teorinių atspindžių, stebėtų 2,7 Å skir. geba	98
Proc. stebėtų/teorinių atspindžių, stebėtų 2,4 Å skir. geba	36

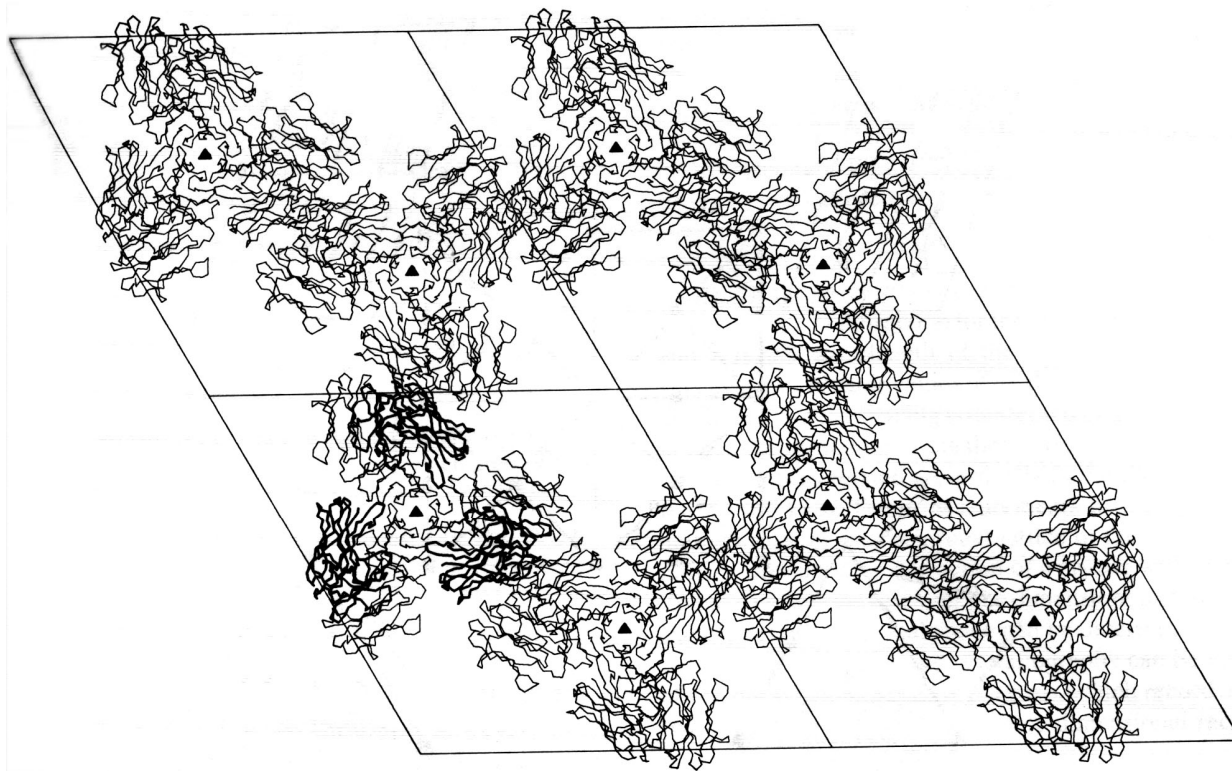
4.2 lentelėje parodytas kristalografinių duomenų statistikos pavyzdys. R-faktorius parodo duomenų kokybę. Apytiksliai vertinant, jeigu R vertė yra didesnė negu 20 proc. (0.2), tai struktūros kokybė yra nepatenkinama. R-faktorius parodo, kiek tiksliai $|F_{stebimas}|$ atspindi $|F_{teorinis}|$. Yra lyginami eksperimentiškai stebėti ir teoriškai apskaičiuoti atspindžių intensyvumai.

Taip pat iš lentelės matome, jog skiriamoji geba rodo maksimalią ribą, už kurios jokių atspindžių nerandame (2.2 Å). Tačiau ne visus teoriškai apskaičiuotus atspindžius matome ir esant mažesnei skiriamajai gebai (duomenų rinkinys nėra pilnas). Visame duomenų rinkinyje buvo matomi tik 98 proc. teoriškai galimų atspindžių. Kiekvienas atspindys buvo stebimas vidutiniškai keturis kartus, .

4.6. Rentgenostruktūrinės baltymų analizės naudojimas

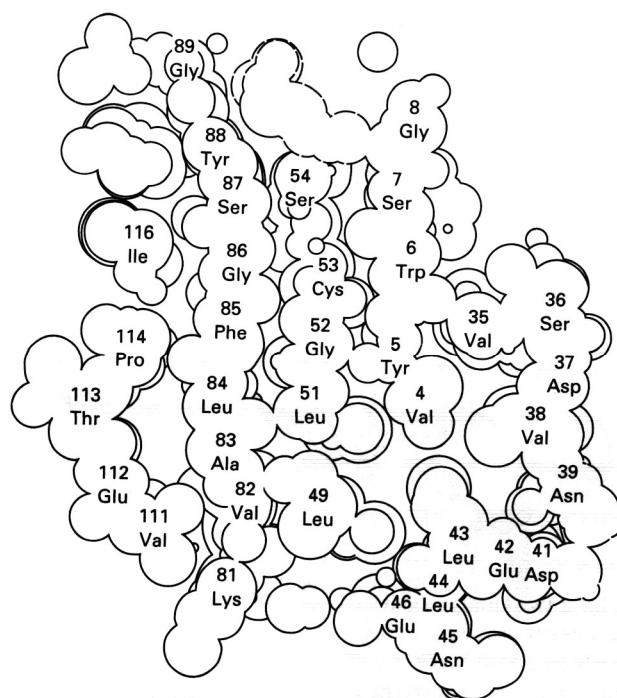
4.6.1. Įvairūs baltymų struktūros vaizdavimo būdai

4.22 pav. yra parodyta, kaip kristalizuojasi tipiškas baltymas. Kaip matome, kristale didelį tūrį užima vanduo – tarp molekulių yra dideli tarpai, kuriuos pripildo vanduo. Šiuo atveju imunoglobulino Fab MCPC603 kristale vanduo užima apie 70 proc. tūrio. Pav. parodytos keturios kristalinės gardelės, imunoglobulino molekulės parodytos linija, kuri dengia tik polipeptidinės grandinės atomus. Nėra parodytos aminorūgščių šoninės grandinės. Trikampiu pažymėta trigubos simetrijos ašies vieta, o dvigubos simetrijos ašis eina per vidurį tarp dviejų trikampių. Imunoglobulinų molekulės sudarytos iš lengvųjų ir sunkiųjų grandinių. Trijų molekulių sunkiosios grandinės pavaizduotos ryškia linija.



4.22 pav. Imunoglobulino Fab MCPC603 kristalo struktūra. Parodytos keturios kristalinės gardelės, padedančios išsivaizduoti baltymų išsidėstymą kristale [8]

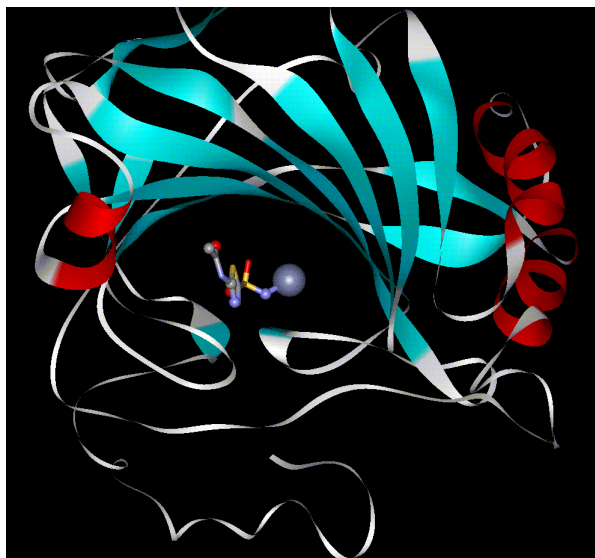
Iš šio paveikslo lengva išsivaizduoti baltymų molekulių išsidėstymą kristale, bet atominės detalės neišryškėja. Jų paryškinimui naudojamos įvairios schemos. Pavyzdžiui, 4.23 pav. parodytas flavodoksino modelio pjūvis. Matome, kaip tankiai yra išsidėstę baltymo atomai.



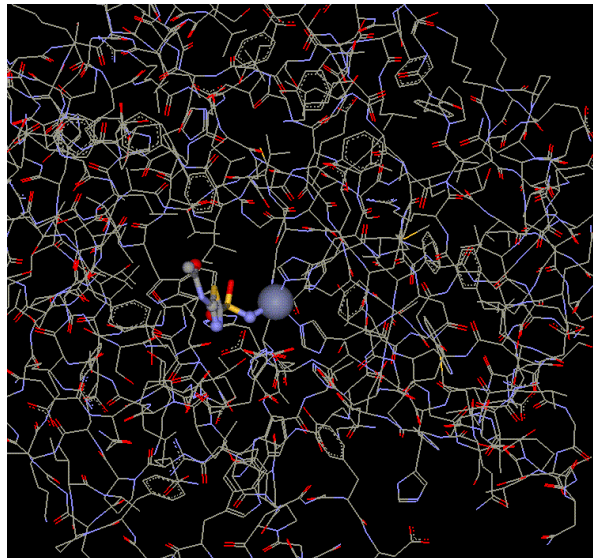
4.23 pav. Flavodoksino baltymo modelio pjūvis, atsižvelgiant į atomų van der Valso spindulius. Trys vienas už kito einantys pjūviai yra nutolę vienas nuo kito per 1 Å. Skaičiai rodo C α atomų vietas. Punktyrine linija parodyta prostetinė FMN grupė (paveikslo viršuje) [8]

4.23 pav. matome, koku tankiu priglunda vienas prie kito kaimyninių aminorūgščių atomai. Taip pat gerai matyti santykiniai atomų dydžiai. Tačiau ir šiame pav. sunku įsivaizduoti molekulinės detalės. Tam labai naudingi trimačiai vaizdai, kuriuose matomas ir giluminis nutolimas tarp atomų. Vienas iš būdų tai pavaizduoti plokštumoje yra stereovaizdas, kuriame viena šalia kitos parodytos dvi struktūros, pasuktos keletu laipsnių viena kitos atžvilgiu. Jis yra dažnai naudojamas publikacijose, tačiau šiandien yra lengviau stebėti baltymų struktūras kompiuterio ekrane.

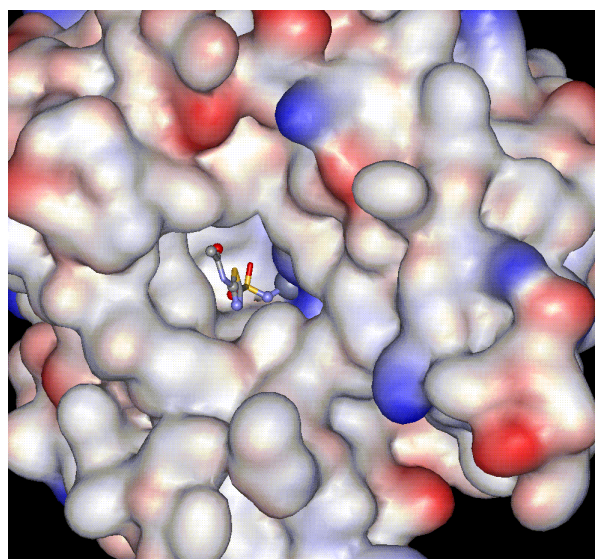
4.24 pav. parodyta žmogaus karboanhidrazė, pavaizduota įvairiais būdais, naudojant Accelrys Viewer nemokamą nuosavybinę programą, arba laisvas programas, pvz. Rasmol, Pymol, Coot. Pabrėžiami įvairūs būdai, naudojami fermento-inhibitoriaus (slopiklio) sąveikai vaizduoti. A dalyje parodyta antrinė baltymo struktūra, matome, kad vyrauja beta struktūra. Centre yra aktyviojo centro katalizinis cinko atomas. B dalyje parodytas baltymo visų atomų paviršius. C dalyje linijomis parodytos visos baltymo kovalentinės jungtys. Tačiau, norint detalesnio sąveikos vaizdo, svarbu parodyti ir tarpatominius atstumus (D dalis).



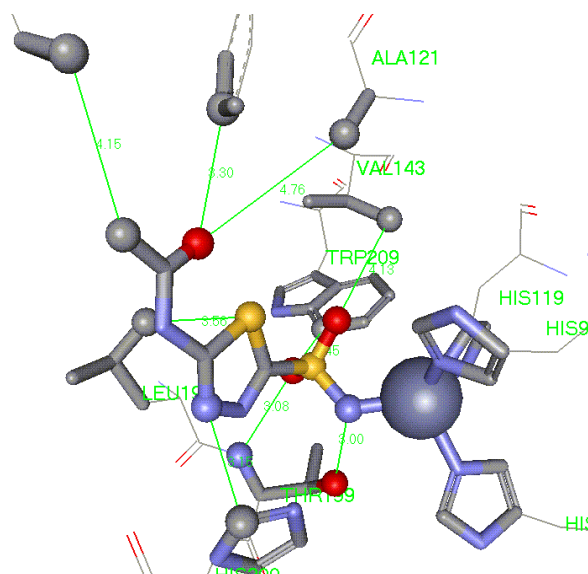
A dalis



B dalis



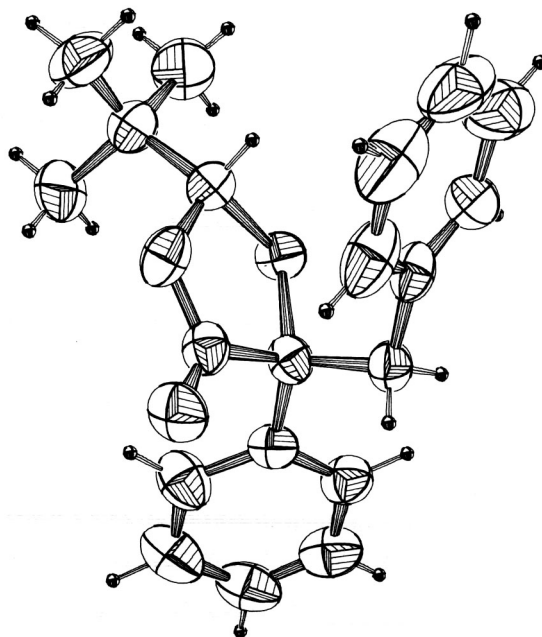
C dalis



D dalis

4.24 pav. Karboanhidrazės struktūra pavaizduota Accelrys Viewer programa, naudojant baltymų duomenų bazės failą 1AZM.pdb. A. Juostinis vaizdavimas, pabrėžiantis antrinę baltymo struktūrą, raudonai parodytos α spiralės, žydrai – β struktūros. Aktyviojo centro cinko atomas – didelė sfera (van der Valso spindulys). Acetazolamido (slopiklio) struktūra parodyta prisijungusi prie cinko atomo, ryšiai atvaizduoti kaip lazdelės, o su baltymu sąveikaujantys atomai – kaip mažos sferos. B. Ta pati struktūra, kaip A, tik parodytas baltymo paviršius. Mėlyna spalva parodyti teigiami krūviai, o raudona – neigiami. C. Ta pati struktūra kaip ir A, tik parodyti visi baltymo atomai, azoto atomai pažymėti mėlynai, deguonies – raudonai ir t.t. D. Didesnė fermento aktyviojo centro dalis, svarbi slopiklio sąveikai su baltymu. Sąveikaujantys atomai – mažos sferos, pamatuoti kai kurie tarpatominiai atstumai

4.25 pav. molekulės struktūra parodyta naudojant *terminius elipsoidus*. Šis vaizdavimo būdas yra dažnai naudojamas pavaizduojant mažas molekules (ne baltymus). Elipsoidas yra tokio dydžio, kokioje erdvės dalyje tikimybė aptikti žymimą atomą lygi 50 proc.. Dėl šiluminio judėjimo atomų koordinatės negalima visiškai tiksliai nustatyti.



4.25 pav. Organinės molekulės struktūra, pavaizduota terminiais elipsoidais [13]

4.6.2. Naudojimasis baltymų duomenų baze

Daugelis išspręstų baltymų struktūrų yra surašytos į duomenų bazę, kuria gali visi naudotis laisvai internete adresu <http://www.rcsb.org>. Šiuo metu joje jau yra apie 50 000 struktūrų. Kiekviena struktūra yra aprašyta PDB formato faile. Failo pradžioje yra struktūros aprašymas, autoriai, publikacijos, kristalografinės gardelės, statistikos aprašymas. Didžiausią failo dalį užima kiekvieno baltymo atomo koordinatės, jų šiluminiai faktoriai kurie aprašo tikimybę rasti atomą tam tikru atstumu nuo jo koordinatės, ir užimtumai, kurie parodo, koks procentas kristalo elementarių gardelių turi nurodytus atomus.

5. Naudota bei rekomenduojama literatūra

1. Klotz R. Chemical thermodynamics. New York: Wiley; 2003. [Cheminės termodinamikos klasikinis vadovėlis, būtinas norintiems suprasti termodinamiką].
2. Yaws C. Chemical properties handbook. [Išsmausias termodinaminių organinių medžiagų savybių žinynas].
3. Dean J. Lange's handbook of chemistry. [Klasikinis cheminių medžiagų savybių žinynas].
4. Matulis D, Kranz J, Salemme R, Todd MJ. ThermoFluor. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry* 2005;44(13):5258-66.
5. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer; 2006. [Puikus, atnaujintas - ir labai išsamus fluorescencijos vadovėlis].
6. Friebolin H. Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. 2nd ed. Weinheim: VCH; 1993. [Puikus MBR vadovėlis, detalai paaiškinantis metodo gilumą].
7. Wüthrich K. NMR of proteins and nucleic acids. New York: John Wiley & Sons; 1986.
8. Creighton TE. Proteins. Structures and molecular properties. New York: W.H. Freeman and Company; 1993. [Klasikinis vadovėlis apie baltymus, jų funkcijas, struktūras bei savybes].
9. Rhodes G. Crystallography made crystal clear. A guide for users of macromolecular models. New York: Academic Press; 1993. [Kristalografijos vadovėlis pradedantiesiems, kur aiškiai išaiškintos pagrindinės kristalografijos savokos ir sprendimai, tačiau yra netikslumų].
10. Stout GH, Jensen LH. X-Ray structure determination. A practical guide. New York: John Wiley and Sons; 1989. [Kristalografijos vadovėlis pažengusiems, kurie planuoja kristalografiją suprasti giliau negi vidutiniškai].
11. Jaffe HH, Orchin M. Theory and applications of ultraviolet spectroscopy. New York: John Wiley and Sons; 1962. [Tai gana sena, tačiau viena klasikinių spektrofotometrijos knygų, labai giliai išaiškinančių šviesos sugerties reiškinius, kuri nepaseno ir yra verta ją skaityti, norint gilintis į spektrofotometriją].
12. Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. Spectrometric identification of organic compounds. 5th ed. New York: John Wiley and Sons; 1991. [Būtina knyga norintiems spektroskopiniais metodais identifikuoti organines medžiagas].
13. Drenth J. Principles of protein X-ray crystallography. New York: Springer-Verlag; 1994. [Detalus baltymų kristalografijos vadovėlis].
14. Biophysics textbook online. Available at: (<http://www.biophysics.org/education/resources.htm>). [Paruoštas laisvai prieinamas, nuolatos atnaujinamas internetinis puslapis, mokslininkai parašo po vieną vadovėlio skyrių savo specializacijos tematikoje. Tai unikalus mokslininkų-biofizikų vadovėlis, kurį verta studijuoti detalai].

6. Angliškų terminų rodyklė

- crystal unit cell*, 130
absorbance, 87
acquisition time, 114
adiabatic calorimeter, 31
anisotropy, 83
baltymai, 6
chemical shift, 108
collisional quenching, 83
correlated spectroscopy, 114
critical point, 23
cross-peaks, 115
differential scanning calorimetry, 52
downfield, 108
enthalpy, 17
entropy, 18
exact differential, 15
expansion coefficient, 14
fluorescence, 79
fluorescence quenching, 83
fluorescence resonance energy transfer, 84
Fourier transformation, 113
free induction decay, 113
Gibbs free energy, 19
gyromagnetic ratio, 104
heat capacity, 18
heat conduction calorimeter, 31
Helmholtz free energy, 18
high-throughput screening, 70
inexact differential, 15
inner filter effect, 101
international conference, 12
intersystem crossing, 81
intrinsic or natural lifetime, 83
isothermal titration calorimetry, 30
lattice points, 131
luminescence, 79
magnetic moment, 104
magnetic or directional quantum number, 105
Massieu function, 19
molar extinction coefficient, 88
molecular replacement, 141
multiple isomorphous replacement, 141
non-radiative decay to S₀, 82
nuclear angular momentum, 104
nuclear magnetic resonance, 104
nuclear Overhauser effect spectroscopy, 115
nuclear spin, 104
phosphorescence, 79
Planck function, 19
power compensation calorimeter, 31
quantitative structure-activity relationship, 91
quenching, 80
Ramachandren map, 142
refinement, 141
resolution, 137
sample cell, 34
saturation, 107
shielding constant, 107
signal to noise ratio, 114
space group, 134
spin-spin coupling, 110
state function, 16
steady-state fluorescence, 79
Stokes shift, 82
structure-activity relationship, 91
thermodynamic property, 16
thermopile/thermocouple, 34
time-resolved fluorescence, 79
total correlation spectroscopy, 115
transmittance, 87
triple point, 23
upfield, 108